

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - PMPGCF
MANUELA ORTEGA MARQUES RODRIGUES

**Efeitos da perda de peso corporal induzida por dieta hipolipídica *ad libitum* e
pela restrição calórica com dieta hiperlipídica na inflamação do tecido adiposo
de camundongos obesos**

Diamantina

2017

MANUELA ORTEGA MARQUES RODRIGUES

Efeitos da perda de peso corporal induzida por dieta hipolipídica *ad libitum* e pela restrição calórica com dieta hiperlipídica na inflamação do tecido adiposo de camundongos obesos

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, nível mestrado, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Elizabethe Adriana Esteves
Coorientador: Prof. Dr. Flávio de Castro Magalhães

Ficha Catalográfica - Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Jullyele Hubner Costa CRB-6/2972

R696e
2017 Rodrigues, Manuela Ortega Marques.
Efeitos da perda de peso corporal induzida por dieta hipolipídica *ad libitum* e pela restrição calórica com dieta hiperlipídica na inflamação do tecido adiposo de camundongos obesos / Manuela Ortega Marques Rodrigues. – Diamantina, 2017.
63 p.

Orientadora: Elizabethe Adriana Esteves
Coorientador: Flávio de Castro Magalhães

Dissertação (Mestrado - Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) –Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Obesidade. 2. Tecido adiposo visceral. 3. Restrição calórica. 4. Dieta hiperlipídica. 5. Dieta hipolipídica. I. Esteves, Elizabethe Adriana. II. Magalhães, Flávio de Castro. III. Título.

CDD 616.398

Elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

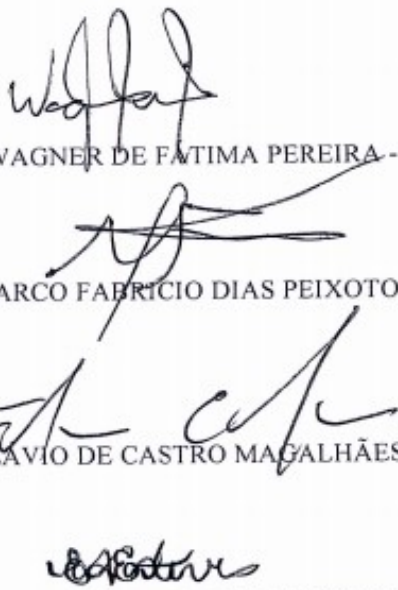
MANUELA ORTEGA MARQUES RODRIGUES

Efeitos da perda de peso corporal induzida por dieta hipolipídica *ad libitum* e pela restrição calórica com dieta hiperlipídica na inflamação do tecido adiposo de camundongos obesos

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, nível mestrado, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Elizabethe Adriana Esteves
Coorientador: Prof. Dr. Flávio de Castro Magalhães

Data de aprovação 01/12/2017



Prof. Dr. WAGNER DE FATIMA PEREIRA - UFVJM

Prof. Dr. MARCO FABRICIO DIAS PEIXOTO - UFVJM

Prof. Dr. FLAVIO DE CASTRO MAGALHÃES - UFVJM

Prof.^a Dr.^a ELIZABETHE ADRIANA ESTEVES - UFVJM

Diamantina, 2017

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me proporcionarem uma ótima educação, sempre acreditarem em mim e investirem nos meus sonhos. Por, mesmo longe, estarem de prontidão a todos os meus chamados nos momentos difíceis. Por me ensinarem a ser humilde, responsável, generosa, independente e dar valor a cada conquista. Pelo amor incondicional.

Às minhas irmãs e ao Bruno, por me darem sempre os melhores conselhos e me mostrarem o lado positivo de todas as circunstâncias.

À minha avó Zilda, por ter me proporcionado uma infância mágica e ao meu avô Gregório que em sua imensa generosidade e sabedoria um dia me disse: “sua inteligência é muito maior, mas sua fé é pequena como um grão de mostarda”, tornando essas palavras um mantra para que eu acreditasse no meu potencial.

À minha orientadora Prof.^a Elizabethe, por acreditar em mim e sempre me encorajar diante das dificuldades. Pelos ensinamentos, paciência e dedicação. E por tornar meu sonho real.

Ao meu coorientador Prof. Flávio, por todo auxílio prestado.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), pela minha graduação em Nutrição e pelo título de mestre em Ciências Fisiológicas. A todos os professores do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG (APQ 00396-14), e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo auxílio financeiro. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela bolsa de estudos.

A todos os companheiros do programa pelo apoio e ajuda nas atividades laboratoriais. Em especial à Lauane, que com toda sua paciência e generosidade me ensinou tudo que estava ao seu alcance, à Nilma Nayara, ao Vinícius, Dirceu e à Carina, que se tornou uma grande amiga.

Aos alunos de iniciação científica: Ana Maria, Camila Sena, Danielli Guedes, Kamila Soares, pelo esforço desmedido e amizade. E ao Paulo Evangelista, pela dedicação nas análises histológicas, amizade e muitas risadas.

À cidade de Diamantina, que me proporcionou anos inesquecíveis. Pelos amigos que aqui fiz e levarei para onde for. Pela paisagem emocionante, principalmente aos finais de tarde com seu pôr do sol inigualável.

Ao Universo, por todas as energias positivas emanadas a mim e a todos ao meu redor.

“Demora um pouco para entender tudo isso; aliás, como falou Guimarães Rosa, “não convém fazer escândalo de começo; só aos poucos é que o escuro é claro”...”

Mario Sergio Cortella

RESUMO

A expansão do tecido adiposo branco na obesidade leva à expressão alterada de proteínas em seus adipócitos, bem como a infiltração de células do sistema imune, especialmente macrófagos, cujas secreções levam ao desenvolvimento da inflamação crônica de baixo grau, a qual é considerada subjacente ao desenvolvimento de inúmeras comorbidades. Dentre as formas de tratamento da obesidade, dietas de restrição calórica (RC) nutricionalmente balanceadas induzem a perda de peso e melhorias em marcadores sistêmicos da inflamação, mas os efeitos diretos no tecido adiposo visceral ainda são controversos. No entanto, existe uma lacuna sobre qual o impacto dessas dietas na inflamação local, mesmo em condições de sobrecarga lipídica. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da perda de peso corporal induzida por dieta hipolipídica *ad libitum* e pela restrição calórica com dieta hiperlipídica na inflamação do tecido adiposo visceral de camundongos obesos. Para tal, inicialmente, camundongos C57BL/6 com 12 semanas de idade, machos, foram divididos em dois grupos: LF – alimentados com dieta controle hipolipídica – do inglês *low fat* (10% das calorias, fonte óleo de soja, rica em ácidos graxos poli-insaturados); e HF – alimentados com dieta controle hiperlipídica – do inglês *high fat* (60% calorias, fonte banha de porco, rica em ácidos graxos saturados) para indução da obesidade. Após oito semanas, seis animais de cada grupo foram eutanasiados para verificação da adiposidade visceral e estado inflamatório (dosagens de proteína C reativa – PCR sérica e hepática). Em seguida, os animais HF foram aleatoriamente divididos em três grupos HF – continuaram recebendo dieta HF; LFAL – submetidos ao emagrecimento pela substituição da dieta HF pela LF e acesso livre (*ad libitum*) e RHF – submetidos ao emagrecimento por receberem quantidades restritas em calorias da dieta HF para atingir o mesmo peso corporal dos animais LFAL. A partir deste momento, esses grupos foram alimentados, juntamente com os animais LF, por mais sete semanas. Ao final, foram avaliados o ganho/perda de peso corporal, a adiposidade, as concentrações séricas e hepáticas de PCR, e as concentrações de leptina, adiponectina, e das citocinas IL-6, TNF e MCP-1 no tecido adiposo retroperitoneal, além da morfologia dos adipócitos e a presença de infiltrados inflamatórios no tecido adiposo retroperitoneal. Ao final da fase de indução da obesidade, os animais HF estavam obesos e inflamados. Ao final da fase de indução da perda de peso, os grupos LFAL e RHF tiveram pesos corporais semelhantes, menores que o HF e se igualaram ao LF. No entanto, houve maior dificuldade em perder peso pelo grupo RHF em comparação ao LFAL, dado pelas diferenças significativas entre os deltas de perda de peso, que foram menores para RHF e pelos coeficientes

de eficiência energética, que foram maiores para o grupo RHF. Os animais LFAL retornaram a adiposidade e a hipertrofia dos adipócitos viscerais a valores semelhantes ao grupo LF. Isto provavelmente foi o que levou à menor concentração de leptina com concomitante aumento da adiponectina e menor infiltração de células inflamatórias neste tecido, igualando-se também ao LF. Em consequência, houve menor concentração tecidual de citocinas pró-inflamatórias, além de menor concentração hepática e circulante de PCR. Já para os animais RHF, houve apenas atenuação da adiposidade e da hipertrofia dos adipócitos retroperitoneais. Isso foi suficiente para restabelecer a concentração local de leptina a níveis semelhantes ao grupo LF, embora não tenha elevado a concentração de adiponectina. Além disso, a infiltração de células inflamatórias manteve-se também elevada. Não houve redução da concentração de citocinas pró-inflamatórias, à exceção da IL-6, que reduziu levemente. A concentração hepática de PCR foi atenuada, o que não refletiu na concentração sérica dessa proteína. Concluiu-se que a restrição calórica com dieta hiperlipídica foi menos eficiente em promover a perda de peso e de adiposidade e não melhorou a inflamação do tecido adiposo visceral, comparada com a dieta hipolipídica *ad libitum*. Inferiu-se que a ingestão de dieta com sobrecarga de lipídeos (60% das calorias) e de ácidos graxos saturados foi mais determinante da inflamação local do que a restrição calórica *per se*.

Palavras chave: Obesidade. Tecido adiposo visceral. Restrição calórica. Dieta hiperlipídica. Dieta hipolipídica. Inflamação.

ABSTRACT

The expansion of white adipose tissue in obesity leads to altered protein expression in its adipocytes, as well as the infiltration of immune cells, especially macrophages, whose secretions lead to the development of chronic low-grade inflammation, which underlies the development of several comorbidities. Among treatments, caloric restriction (CR) nutritionally balanced diets induce weight loss and ameliorates inflammation systemic markers, but adipose tissue effects are still controversial. Moreover, there is a gap on the impact of these diets on local inflammation, even under lipid overload. Thus, the aim of this study was to evaluate effects of body weight loss induced by a low fat *ad libitum* diet and a CR in a high fat diet in the visceral adipose tissue inflammation of obese mice. Firstly, 12 weeks of age male C57BL/6 mice were divided into two groups: LF - fed a control low fat diet (10% calories, source soybean oil, high in polyunsaturated fatty acids); and HF - fed a control high fat diet (60% calories, source lard, high in saturated fatty acids) for obesity induction. After eight weeks, six animals from each group were euthanized to verify visceral adiposity and inflammatory status (serum and hepatic C-reactive protein-CRP). Then, HF animals were randomly divided into three groups: HF – kept at HF diet; LFAL - a weight loss group that was switched from HF to LF and maintained on it *ad libitum*; RHF - a weight loss group that received restricted amounts of HF to maintain the same body weight as LFAL. Thereafter, these groups were fed, along with the LF animals, for another seven weeks. At end, body weight gain / loss, adiposity, serum and hepatic CRP concentrations, and adipose retroperitoneal tissue concentrations of leptin, adiponectin, IL-6, TNF and MCP-1 were evaluated, as well as adipocyte morphology and the presence of inflammatory infiltrates in the retroperitoneal adipose tissue. Obesity was induced, since HF animals had higher weights, adiposity and were inflamed. At the end of the weight loss period, both LFAL and RHF had similar body weight, lower than HF and equal to LF. However, it was more difficult to loose weight by the RHF group compared to LFAL, since weight loss deltas were lower for RHF and energy efficiency ratios were higher for RHF group. LFAL animals returned visceral adiposity and retroperitoneal adipocyte hypertrophy similarly to the LF group. Also, there was a lower leptin level with concomitant increase of adiponectin and less infiltration of inflammatory cells in this tissue, also matching to LF. Still, there was a lower tissue concentration of proinflammatory cytokines, and a lower hepatic and serum CRP. For RHF animals, there was only an attenuation in adiposity and visceral adipocyte hypertrophy, although it was sufficient to restore local leptin concentration similarly to LF. However, this regimen was not able to elevate the adiponectin concentration. In addition, the inflammatory cells infiltration was highly

elevated. There was no reduction in proinflammatory cytokines concentration, despite IL-6, which was reduced slightly. Hepatic CRP concentration was attenuated, which did not reflect in its serum concentrations. In mice with diet-induced obesity, the weight loss by means a CR in a high fat diet was less effective in promoting weight and adiposity losses and it did not improve visceral adipose tissue inflammation. It can be inferred that a lipid overload (60% from calories) as well as a saturated fatty acid surplus from the high fat diet were more determinant of local inflammation than caloric restriction *per se*.

Keywords: Obesity. Visceral adipose tissue. Caloric restriction. High fat diet. Low fat diet. Inflammation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Obesidade: epidemiologia, etiologia e riscos à saúde	12
2.2 Biologia do tecido adiposo	13
2.3 Expansão do tecido adiposo na obesidade e inflamação crônica de baixo grau	17
2.3.1 Características secretórias do tecido adiposo inflamado	19
2.4 Restrição calórica, lipídeos dietéticos, obesidade e inflamação	23
2.4.1 Associação entre restrição calórica com dieta hiperlipídica na inflamação da obesidade	26
3 OBJETIVOS	29
3.1 Geral	29
3.2 Específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Ensaio Biológico	29
4.1.1 Animais e condições experimentais	29
4.1.2 Dietas experimentais	30
4.1.3 Desenho experimental	31
4.2 Procedimentos de análises	33
4.2.1 Ingestão alimentar e calórica, e antropometria	33
4.2.2 Concentrações séricas e hepáticas de proteína C reativa (PCR)	35
4.2.3 Concentrações de adipocinas e citocinas do tecido adiposo retroperitoneal	36
4.2.4 Análises histomorfométricas e infiltração de células inflamatórias no tecido adiposo retroperitoneal	36
4.2.5 Análises estatísticas	37
5 RESULTADOS	38
6 DISCUSSÃO	46
7 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS E CONCLUSÃO	52
8 REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A obesidade é uma enfermidade crônica, de origem multifatorial e considerada um importante problema de saúde pública porque afeta milhões de adultos e crianças no mundo. Ela aumenta o risco para doenças cardiovasculares, diabetes do tipo 2, esteatose hepática não alcoólica e outras doenças, tais como o câncer (SANCHEZ *et al.*, 2011).

Basicamente, a obesidade é o resultado de um excessivo consumo energético em relação ao gasto, e pode ser caracterizada como o aumento do peso corporal resultante do excessivo acúmulo de gordura no tecido adiposo, especialmente no tecido adiposo branco (FIELD, 2014).

Sabe-se que a expansão do tecido adiposo branco na obesidade leva à expressão alterada de proteínas em seus adipócitos, bem como a infiltração de células do sistema imune, especialmente macrófagos, ambos com características funcionais pró-inflamatórias. Esses eventos são peças chave no desenvolvimento de uma inflamação crônica de baixo grau (DISPIRITO e MATHIS, 2015) a qual é considerada subjacente ao desenvolvimento das comorbidades citadas (GO *et al.*, 2013). Considerando a localização de depósitos corporais de tecido adiposo branco, estudos epidemiológicos indicam que a maior abundância deste tecido na região visceral está diretamente relacionada ao desenvolvimento das várias comorbidades endócrino-metabólicas, especialmente doenças cardiovasculares e diabetes do tipo 2 (KANHAI *et al.*, 2012).

Paralelamente, dentre as formas de tratamento da obesidade, dietas de restrição calórica (RC) nutricionalmente balanceadas são amplamente utilizadas para promover a perda de peso e atenuar e, ou reduzir os riscos para o desenvolvimento das comorbidades associadas. A quantidade de gordura e sua composição em ácidos graxos parecem ser importantes nessas dietas. Essas dietas induzem a perda de peso e melhorias em marcadores sistêmicos da inflamação. Entretanto, a adesão a esses regimes é pequena, o que dificulta a manutenção da perda de peso.

Além disso, existe uma lacuna sobre qual o impacto das dietas de RC na inflamação local e sistêmica, mesmo em condições de excesso de lipídeos, ou seja, não está claro o quanto o impacto dessas intervenções, especialmente na inflamação local, seria determinado pelo déficit calórico, ou pela quantidade e composição em ácidos graxos (SACKS *et al.*, 2009).

Diante desse contexto, de uma maneira geral, este trabalho foi fundamentado nas seguintes premissas:

1. A inflamação desencadeada no tecido adiposo obeso, especialmente no visceral, está intimamente relacionada com o desenvolvimento de comorbidades.

2. Em humanos, as dietas de RC nutricionalmente balanceadas são capazes de promover perda de peso e melhorias em marcadores sistêmicos da inflamação subjacente à obesidade, mas usualmente apresentam baixa adesão entre os indivíduos obesos.
3. A quantidade e a qualidade dos lipídeos dietéticos podem influenciar na perda de peso, mas ainda são escassas as informações sobre seus impactos no estado inflamatório do tecido adiposo visceral.
4. Efeitos diferenciais da indução da perda de peso por meio da restrição calórica com dieta hiperlipídica, em comparação a regimes considerados saudáveis (dieta hipolipídica) na inflamação do tecido adiposo visceral, ainda são pouco investigados.

Assim, considerando as premissas descritas anteriormente, nossa hipótese é de que a restrição calórica com dieta hiperlipídica promoverá a mesma perda de peso em camundongos obesos que a dieta hipolipídica *ad libitum*, mas esses regimes exercerão efeitos diferentes em nível de inflamação do tecido adiposo visceral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Obesidade: epidemiologia, etiologia e riscos à saúde

A obesidade é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal que pode atingir graus capazes de afetar a saúde (WHO, 2004). De acordo com Janz (2017), ela resulta de uma combinação de ingestão energética excessiva, falta de atividade física, e susceptibilidade genética. Assim, o consumo excessivo de alimentos com alto valor energético associado à redução da prática de atividade física são aspectos importantes no desenvolvimento da obesidade (SABIN *et al.*, 2015).

Do ponto de vista epidemiológico, o excesso de gordura corporal e suas consequências metabólicas são epidemias mundiais. A projeção é que, em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos no mundo estejam com sobrepeso; e mais de 700 milhões, obesos. O número de crianças com sobrepeso e obesidade no mundo poderá chegar a 75 milhões (WHO, 2016). No Brasil, a obesidade nos adultos cresceu 60% em 10 anos, passando de 11,8% em 2006 para 18,9% em 2016, sendo a frequência semelhante entre os sexos masculino e feminino. Além disso, foi constatado que a prevalência da obesidade duplica após os 25 anos e é maior entre os que apresentam menor escolaridade (BRASIL, 2017).

A etiologia da obesidade é complexa e multifatorial. Ela é considerada uma desordem crônica complexa e que aumenta o risco para várias doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), particularmente doenças cardiovasculares, diabetes do tipo 2, hipertensão, certos tipos de cânceres, apnéia obstrutiva do sono, osteoartrite (JUNG *et al.*, 2016), contribuindo assim para o aumento da morbidade e da mortalidade e redução da expectativa de vida (CAPUTO *et al.*, 2017).

Do ponto de vista da saúde pública, as DCNT, tais como a obesidade e algumas das suas comorbidades, por serem de longa duração, são as que mais demandam ações, procedimentos e serviços de saúde, gerando no Brasil uma sobrecarga do Sistema Único de Saúde (SUS). Estima-se que os gastos do Ministério da Saúde com atendimentos ambulatoriais e internações em função dessas doenças sejam de aproximadamente R\$ 7,5 bilhões por ano (CEZÁRIO *et al.*, 2005). Assim, diante desse impacto da obesidade na saúde e bem-estar da população, inúmeras pesquisas tentam desvendar causas, mecanismos e formas de tratar e controlar essa epidemia.

2.2 Biologia do tecido adiposo

Segundo Junqueira e Carneiro (2008), o tecido adiposo (TA) é um tipo especial de tecido conjuntivo em que se observa predominância de células adiposas, denominadas adipócitos. Essas células podem ser encontradas isoladas ou em pequenos grupos no tecido conjuntivo frouxo, porém a maioria delas forma grandes agregados, constituindo o tecido adiposo distribuído pelo corpo.

O desenvolvimento do TA e a bioquímica do adipócito são áreas de pesquisa que têm intrigado investigadores por décadas. Originalmente, o TA era considerado como um simples órgão de estoque. No entanto, recentes avanços têm demonstrado que o adipócito não é apenas um estoque passivo de lipídeos, mas também uma célula extremamente dinâmica que desempenha um papel fundamental no balanço energético e, sobretudo, na homeostase corporal (BERNLOHR *et al.*, 2002). De fato, o TA vem sendo considerado a maior glândula endócrina no corpo, exercendo funções autócrina, parácrina e endócrina e desempenhando papéis múltiplos na regulação de processos sistêmicos que modificam a disponibilidade de nutrientes (CASTRO *et al.*, 2014).

O TA é o mais prevalente tecido do corpo humano e não representa um único compartimento homogêneo, mas sim um tecido com depósitos regionais específicos que possuem diferentes funções biológicas (Figura 1). Além disso, os compartimentos de tecido

adiposo individuais têm associações mais fortes com processos fisiológicos e patológicos do que a massa total de tecido adiposo (SHEN *et al.*, 2007).

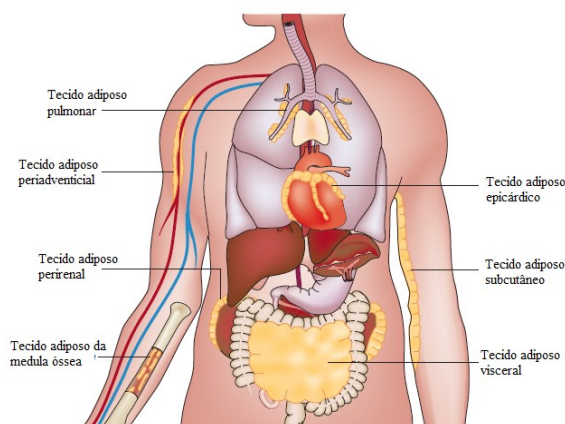


Figura 1: Compartimentos corporais de tecido adiposo. Adaptado de Ouchi *et al.* (2011).

Os adipócitos maduros constituem a maioria das células do TA. Além destes, existem vários outros tipos celulares, tais como as células tronco multipotentes, pré-adipócitos, fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliais e macrófagos. O TA é também irrigado por capilares e vasos sanguíneos. Cerca de um terço do TA é constituído de adipócitos maduros presentes no parênquima celular e os dois terços restantes compreendem células da porção vascular estromal (ARMANI *et al.*, 2010). (Figura 2).

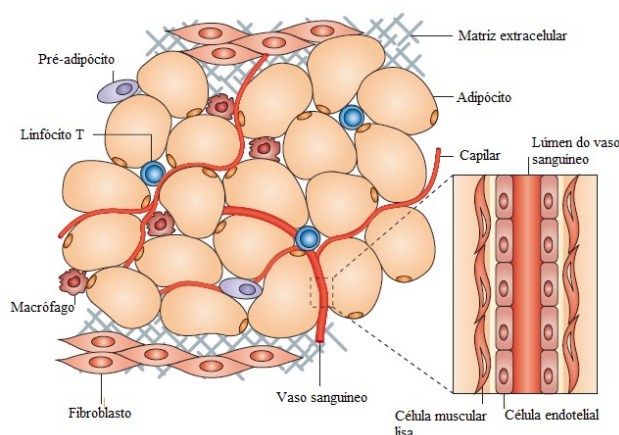


Figura 2: Componentes celulares do tecido adiposo. Adaptada de Ouchi *et al.* (2011).

Existem dois principais tipos de adipócitos no corpo humano, os do TA branco (TAB) e os do TA marrom (TAM) que podem coexistir em todos os locais de TA (OUCHI *et al.*, 2011).

O TAM é formado por adipócitos multiloculares e que contém numerosas gotículas lipídicas e muitas mitocôndrias (Figura 3). Ele é relativamente escasso e seu maior papel é

dissipar energia na forma de calor, por meio da ação da proteína mitocondrial desacopladora-1 ou (UCP-1) (GESTA *et al.*, 2007). Este tecido está normalmente presente na região cervical, supra clavicular, paravertebral, interescapular e perirenal em recém-nascidos (TAM *et al.*, 2012), sendo sua função termogênica essencial para manter a temperatura de neonatos expostos ao frio (SETHI e VIDAL-PUIG, 2007).

Os adipócitos do TAB ou comum ou amarelo, são uniloculares e, quando completamente desenvolvidos, contem apenas uma gotícula de gordura que ocupa quase todo o citoplasma (Figura 3) (CINTI *et al.*, 2012). O TAB está amplamente distribuído e sua função primária é estocar triacilgliceróis (TG) em períodos de excesso de energia e liberar energia na forma de ácidos graxos livres durante deprivações de energia (GREGOIRE *et al.*, 1998). Além disso, modela a superfície corporal, protege contra choques mecânicos, contribui para o isolamento térmico do organismo, além de preencher espaços entre outros tecidos e auxiliar a manter certos órgãos em suas posições normais (CINTI *et al.*, 2012).

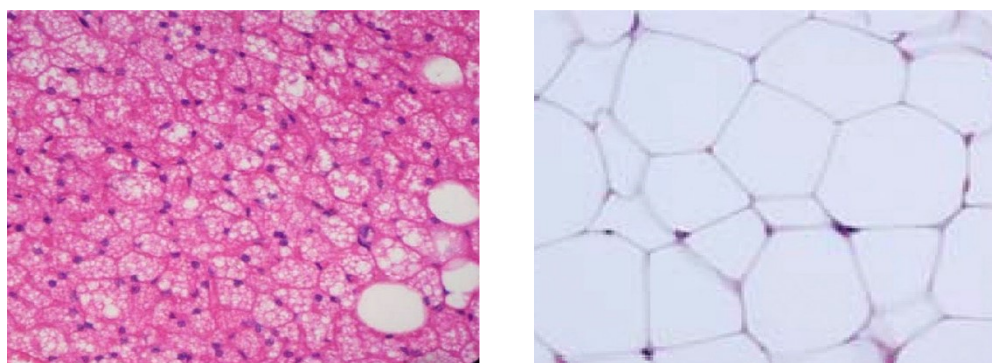


Figura 3: Fotomicrografia de tecido adiposo marrom (esquerda) com suas células características contendo núcleos esféricos centrais e múltiplas gotículas de lipídeos no citoplasma. Para comparação, à direita mostra-se o tecido adiposo branco, com gotícula única de lipídeos ocupando quase todo o citoplasma da célula. Adaptado de OUCHI *et al.* (2011).

É importante ressaltar que, recentemente, foi demonstrada a existência de adipócitos no TAB, chamados “beges” ou “brite” (*brown in white*). Esses adipócitos são células residentes do TAB positivas para UCP-1 que, dependendo das condições, comportam-se tanto como adipócitos brancos clássicos, estocando energia na forma de triglicerídeos, quanto como adipócitos marrons, dissipando energia do metabolismo oxidativo como calor, como por exemplo quando expostos ao frio (CASTRO *et al.*, 2017).

O TAB é considerado um órgão complexo com distribuição de múltiplos depósitos subcutâneos e viscerais em todo o corpo (SORISKY *et al.*, 2013). Os depósitos subcutâneos em

humanos, estão localizados abaixo da pele e com quantidades proeminentes no abdômen e nas pernas. Os principais locais de tecido adiposo visceral em humanos e roedores são os depósitos abdominais, mesentérico e omental. O depósito omental compreende uma fração maior de gordura corporal em humanos comparado com roedores, podendo ser o epididimal em roedores machos, funcionalmente equivalente ao omental em humanos (TCHKONIA *et al.*, 2013). Outros depósitos de tecidos adiposo visceral frequentemente estudados em roedores incluem o mesentérico e o retroperitoneal (DISPIRITO e MATHIS, 2015).

O TAB que se dispõe na região visceral, quando em excesso, tem uma associação conhecida com complicações metabólicas e com anormalidades de fatores humorais, que regulam as quantidades circulantes de glicose, insulina e lipídios. Conseqüentemente, quanto maiores os estoques de lipídeos viscerais, maiores os riscos de possíveis doenças cardiometabólicas (MAURIÈGE P *et al.*, 1999).

A capacidade de o adipócito armazenar energia é considerada uma das principais funções do TA (SUGANAMI *et al.*, 2012). Quando ocorre aumento da ingestão alimentar e/ou diminuição do gasto energético, o excesso de energia é armazenado no TAB na forma de triglicerídeos (SETHI e VIDAL-PUIG, 2007), o que é facilitado pela insulina (ITOH *et al.*, 2011). Em períodos de jejum ou no exercício, o tecido adiposo libera energia na forma de ácidos graxos (SORISKY *et al.*, 2013) sob efeito do aumento da secreção de catecolaminas ou outros hormônios lipolíticos (HAUNER, 2004). Assim, os adipócitos funcionam como sensores das quantidades de lipídeos, transmitindo informações para o sistema nervoso central o que afeta a fome, a saciedade e o sono (BERNLOHR *et al.*, 2002). Além disso, ele age como um órgão que recebe informações de outros tecidos (cérebro, fígado e músculos) e produz proteínas (adipocinas) de ações local e sistêmica, para regular o balanço de nutrientes. Adicionalmente, é infiltrado por células do sistema imune inato e do adaptativo e troca informações com elas (DISPIRITO e MATHIS, 2015)

Assim, o TA é considerado um órgão multifuncional capaz de produzir e secretar vários fatores, que agem de forma autócrina, parácrina e endócrina (GOOSSENS, 2008), os quais permitem uma comunicação complexa entre o TA e órgãos vizinhos e distantes, influenciando uma variedade de processos fisiológicos e patofisiológicos (SUGANAMI e OGAWA, 2010). Esses fatores podem afetar múltiplas funções biológicas como ingestão alimentar, metabolismo energético, pressão arterial, homeostase da glicose, sensibilidade à insulina, imunidade e inflamação (SETHI e VIDAL-PUIG, 2007; MAJKA *et al.*, 2011, TORRES-LEAL *et al.*, 2012). Além disso, os adipócitos expressam receptores para vários hormônios, adipocinas e fatores de

crescimento (TORRES-LEAL *et al.*, 2012) e apresentam controle neuro-hormonal (ARMANI *et al.*, 2010).

Vale ressaltar que o perfil secretório do tecido adiposo pode ser influenciado e modificado por alterações na sua composição celular, incluindo alterações no número, fenótipo e localização de células estruturais, vasculares e imunes. A expressão de adipocinas também pode variar dependendo da localização do depósito de TA (SAMARAS *et al.*, 2010).

2.3 Expansão do tecido adiposo na obesidade e inflamação crônica de baixo grau

Uma característica única do TAB é a extraordinária capacidade de modificar suas dimensões, em resposta ao estado nutricional, por meio de remodelamento induzido por uma série de mecanismos. Em nível tecidual, o TAB altera seu tamanho, função, estado inflamatório e distribuição corporal. Do ponto de vista celular, o TAB modifica a composição de sua matriz extracelular (MEC), vascularização, tamanho e número dos adipócitos, níveis de estresse oxidativo, perfil de secreção de adipocinas e o estado inflamatório de células imunes infiltrantes (SUN, *et al.*, 2011).

A expansão do TAB ocorre pelo aumento do tamanho de adipócitos pré-existentes devido ao acúmulo de lipídeos (hipertrofia) ou pelo aumento do seu número, por meio do recrutamento de pré-adipócitos do *pool* de células progenitoras residentes (hiperplasia), sendo este último processo o responsável pela formação de novos adipócitos (adipogênese) (RUTKOWSKI *et al.*, 2015).

Na obesidade, a sobrecarga lipídica no TAB pode torná-lo severamente disfuncional e o mesmo então falhar em se expandir apropriadamente para armazenar a energia excedente (Figura 4). Em nível sistêmico, esta disfunção resulta em deposição ectópica de gordura em outros tecidos que regulam a homeostase metabólica (fígado, músculo esquelético, pâncreas endócrino, por exemplo). Isto resulta em progressiva resistência à insulina e aumento do risco para diabetes do tipo 2 (KUSMINSKI *et al.*, 2016).

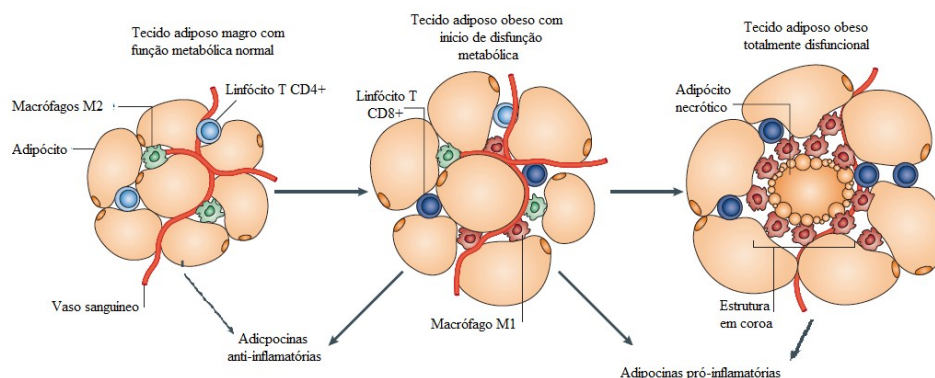


Figura 4: Modulação fenotípica do tecido adiposo branco. Adaptado de Ouchi *et al.* (2011).

Assim, a expansão do TAB induzida pela obesidade por meio da hipertrofia é acompanhada pela elevação da secreção de adipocitocinas, as quais incluem uma grande variedade de fatores pró-inflamatórios, tais como o fator de necrose tumoral do tipo α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), leptina, resistina e proteína quimioatraente de monócitos do tipo 1 (MCP-1 ou CCL-2), com uma redução paralela de fatores anti-inflamatórios, tais como a interleucina-10 (IL-10) e a adiponectina (SUN *et al.*, 2011, OKAMOTO *et al.*, 2008).

Com a progressão da obesidade, sinais quimiotáticos, tais como a MCP-1, induzem o recrutamento de monócitos, os quais infiltram o TAB obeso (WEISBERG *et al.*, 2003, XU *et al.*, 2003). As células imunes residentes do TAB e os monócitos recém-recrutados tornam-se então, polarizados para macrófagos pró-inflamatórios M1 ou "classicamente ativados", em oposição aos macrófagos anti-inflamatórios M2 "alternativamente ativados" (LUMENG *et al.*, 2007, PATSOURIS *et al.*, 2008). Macrófagos M1 desregulam os processos de sinalização dos adipócitos e prejudicam a sensibilidade à insulina (SUN *et al.*, 2011, LACKEY *et al.*, 2016) primariamente por secretar citocinas pró-inflamatórias e por "circundarem" adipócitos apoptóticos para criar estruturas "semelhantes a coroas" (*crown-like structures*) (LUMENG *et al.*, 2007).

O TAB disfuncional apresenta também um maior grau de fibrose e hipóxia. A hipóxia é um dos primeiros determinantes da disfunção do TAB e um dos principais fatores iniciantes do estresse da matriz extracelular (MEC) (SUN *et al.*, 2013). A expansão rápida do TAB, devido à sobrecarga lipídica, não é acompanhada pelo processo de neo-vascularização, surgindo assim, um estado de hipóxia (TRAYHURN, 2014). De fato, Krishnan, J. *et al.*, 2012, demonstraram que o fator de transcrição induzível por hipóxia 1 α (HIF-1 α), considerado um regulador chave da homeostase do oxigênio, apresenta atividade aumentada em obesos. Em camundongos, a superexpressão do HIF-1 α em TAB inicia a fibrose e os eventos inflamatórios locais

(HALBERG *et al.*, 2009). Em contraste, a remoção deste fator no TAB promove melhorias metabólicas na obesidade induzida por dieta (SUN *et al.*, 2013).

Por outro lado, a MEC representa a sustentação dos adipócitos e sua rigidez, composição e remodelação e é um determinante crucial da expansibilidade do TAB na medida em que a obesidade avança (SUN *et al.*, 2013). A fibrose é uma consequência patológica da desregulação da MEC, caracterizada por abundância de proteínas, especialmente de colágeno (BLUM, 2011). Quanto maior a flexibilidade da MEC, mais o TAB consegue se expandir em um contexto saudável, livre de estresse. Entretanto, se a MEC se torna inflexível, os adipócitos não conseguem estocar lipídeos excedentes de maneira apropriada, o que dificulta seu crescimento e promove a lipotoxicidade (SUN *et al.*, 2011, SUN *et al.*, 2013).

O colágeno do tipo VI está presente em abundância na MEC do TAB e desempenha um papel crucial como componente fibrótico da obesidade (KHAN *et al.*, 2009). Em modelos animais de obesidade genética e dietética, a deficiência do colágeno tipo VI resulta em expansão desinibida dos adipócitos, o que aumenta a capacidade de estoque do tecido adiposo e minimiza a acumulação ectópica de lipídeos em outros tecidos, e está associado com melhorias na sensibilidade à glicose e na homeostase lipídica (KHAN *et al.*, 2009).

Assim, em linhas gerais, a hipertrofia dos adipócitos devido ao estoque excessivo de lipídeos mais a hiperplasia devido à diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros, conduz a uma série de alterações disfuncionais nessas células que pode levar à morte eventual do adipócito ou induzir as respostas inflamatórias (ARKAN *et al.*, 2005) mencionadas anteriormente.

2.3.1 Características secretórias do tecido adiposo inflamado

A inflamação do tecido adiposo, associada à obesidade, inicia-se localmente e torna-se sistêmica com a piora do estado metabólico do adipócito devido ao acúmulo desordenado de lipídeos nessas células. Esta condição, denominada inflamação crônica de baixo grau, tem recebido expressiva atenção como provável alvo terapêutico, devido ao seu papel na patogênese das inúmeras desordens associadas à obesidade, tais como a resistência à insulina, o diabetes do tipo 2, a doença hepática não alcoólica, doenças cardiovasculares, dentre outras (WU *et al.*, 2010).

Em linhas gerais, a resposta pró-inflamatória crônica observada na obesidade é caracterizada pela produção anormal de proteínas (adipocinas) pelo tecido adiposo (adipócitos e macrófagos) e pela ativação de várias vias de sinalização pró-inflamatórias que resultam também

na produção de vários biomarcadores da inflamação (FUENTES *et al.*, 2013). Embora os mecanismos exatos que levam ao seu desenvolvimento ainda não estejam totalmente esclarecidos, a infiltração de macrófagos e a secreção desregulada de proteínas e citocinas com atividade pró-inflamatória, tanto pelos macrófagos quanto pelos adipócitos, são considerados passos iniciais que associam a obesidade à inflamação sistêmica (WEISBERG *et al.*, 2003, MAKKI *et al.*, 2013).

Assim, de um lado, estudos indicam que a participação dos macrófagos na produção local de mediadores inflamatórios é fundamental (XU *et al.*, 2003; WEISBERG *et al.*, 2003). Essas células, conforme descrito anteriormente, se acumulam no tecido adiposo de animais e humanos obesos, participando intensamente da secreção local de citocinas e quimiocinas, o que contribui para a geração e amplificação do processo inflamatório local, e facilita a gênese da resistência insulínica relacionada à obesidade (ROCHA *et al.*, 2011).

Os macrófagos podem apresentar heterogeneidade significativa em sua função, a depender de fatores locais capazes de estimular programas distintos de ativação, com diferentes perfis de mediadores inflamatórios, marcadores de superfície e enzimas metabólicas (SICA e MANTOVANI, 2012). Assim, conforme descrito anteriormente, macrófagos M1 ou “classicamente ativados” são induzidos por mediadores pró-inflamatórios, como interferon-gama (IFN- γ) e apresentam produção aumentada de citocinas proinflamatórias, como o TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 e espécies reativas de oxigênio (como óxido nítrico [NO]) (SICA e MANTOVANI, 2012). Já os macrófagos M2, ou “alternativamente ativados”, são induzidos por outras citocinas como as interleucinas-4 e 13 (IL-4 e IL-13), e apresentam um perfil com expressão significativa de mediadores anti-inflamatórios, como a interleucina-10 (IL-10) e IL-1Ra (MAKKI *et al.*, 2013). Os macrófagos M2 também apresentam produção aumentada de arginase, que pode competir com a arginina, necessária para a produção de NO e promovem reparo tecidual. Uma vez recrutados para o tecido adiposo obeso, macrófagos M1, liberam citocinas, as quais ativam vias intracelulares pró-inflamatórias em células vizinhas e em tecidos mais distais, e também promovem o recrutamento e a infiltração de macrófagos adicionais para o tecido, o que contribui para a piora do estado inflamatório (MORINO *et al.*, 2006).

De outro lado, a expansão do tecido adiposo também provoca alterações na sua secreção de inúmeras adipocinas, que também exercem impacto significativo na instalação, manutenção e, ou piora do estado pró-inflamatório (FUENTES *et al.*, 2013). Dentre elas, destacam-se a leptina e a adiponectina (Figura 5).

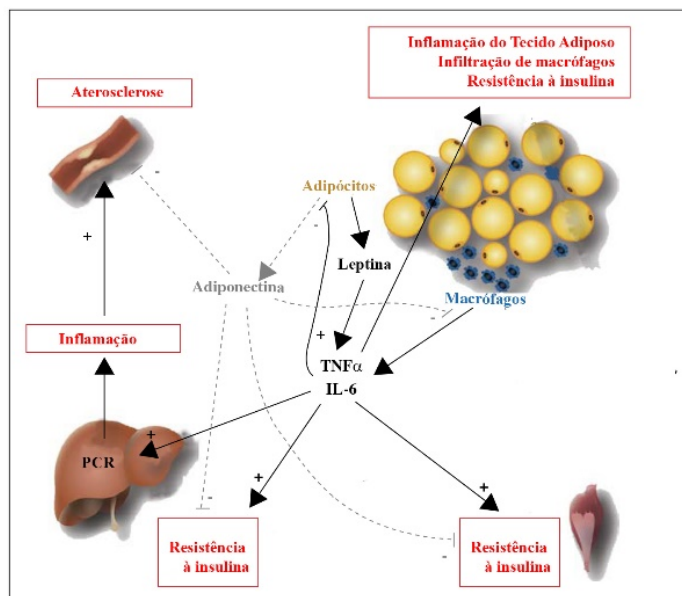


Figura 5: Expressão e secreção de adipocinas pelo TA na obesidade. Adpatado de Bastard *et al.* (2006).

A leptina, uma das principais adipocinas, é uma proteína produzida pelos adipócitos, sendo que seus níveis circulantes se correlacionam positivamente com a massa de tecido adiposo, conteúdo de triglicerídeos e condição nutricional (LASTRA *et al.*, 2006). O controle do apetite é função básica da leptina. Entretanto, ela também desempenha papel chave no controle da resposta imune e da inflamação (MATARESE *et al.*, 2005). Elevadas concentrações teciduais e séricas de leptina estão associadas à proliferação de linfócitos T, a indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos (IL-6 e TNF- α) e monócitos, e da proteína C reativa (PCR) nos hepatócitos (LOFFREDA *et al.*, 1998).

A adiponectina é sintetizada principalmente pelos adipócitos, mas também é expressa em células musculares esqueléticas, cardiomiócitos e células endoteliais (DELAIGLE *et al.*, 2004; PINEIRO *et al.*, 2005; WOLF *et al.*, 2006). Esta adipocina circula no soro em concentrações consideradas altas (5 a 10 mg/ml) comparadas com as da leptina (poucos ng/ml) e apresenta uma ampla faixa de efeitos biológicos. A adiponectina exerce efeitos anti-inflamatórios, inibindo a expressão de moléculas de adesão induzidas pelo TNF (molécula de adesão endotelial - ICAM-1 - e da molécula de adesão celular vascular - VCAM-1) e induz a produção de interleucina-10 (IL-10) e do agonista do receptor de interleucina 1 (IL-1Ra) em monócitos, macrófagos e células dendríticas, além de suprimir a produção de IFN- γ em macrófagos (OUCHI *et al.*, 1999; YOKOTA *et al.*, 2000; WOLF *et al.*, 2004; YAMAGUCHI *et al.*, 2005).

Além das adipocinas, o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), a interleucina-6 (IL-6) e a quimioatraente de monócitos do tipo 1 (MCP-1), merecem destaque por seus papéis cruciais na instalação, manutenção e piora do estado inflamatório.

A MCP-1 ou CCL-2 é uma quimiocina secretada por adipócitos hipertróficos. Tem sido relatado que a secreção de MCP-1 aumenta localmente e também no plasma de humanos e roedores obesos (KIM *et al.*, 2006). Esta quimiocina é capaz de estimular o recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo. Usando modelo animal de obesidade induzida pela dieta (camundongos C57BL/6), Oh *et al.* (2012) e Kanda *et al.* (2006) demonstraram que a deleção desta quimiocina ou de seu receptor CCR2 (WEISBERG *et al.*, 2006) diminuiu o conteúdo de macrófagos pró-inflamatórios e a inflamação do tecido adiposo. Por outro lado, a super-expressão tecido-específica de MCP-1 aumentou o conteúdo de macrófagos pró-inflamatórios no tecido adiposo (KAMEI *et al.*, 2006). Então, o eixo CCL-2/CCR-2 foi sugerido como um dos principais promotores do recrutamento de células inflamatórias para o tecido adiposo de camundongos obesos.

O TNF- α é produzido principalmente por macrófagos e também por algumas outras células, incluindo células linfóides, mastócitos, células endoteliais vasculares, miócitos cardíacos, adipócitos, fibroblastos e tecido neuronal. A expressão de TNF- α está aumentada no TA de modelos animais de obesidade e diabetes do tipo 2 (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993). Por outro lado, a neutralização da sinalização celular induzida pelo TNF- α em animais obesos leva a melhorias na sensibilidade à insulina no tecido adiposo e muscular esquelético (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1994, UYSAL *et al.*, 1997).

Em nível mecanístico, o TNF- α atenua a fosforilação induzida por insulina do resíduo de tirosina do receptor de insulina e do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) no músculo e no tecido adiposo, promovendo resistência à insulina (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1994). Esses dados suportam a ideia de que as funções do TNF- α como citocina pró-inflamatória exercem papel crucial na resistência à insulina relacionada com a obesidade. Além disso, evidências mostram que o TNF-alfa também desempenha um papel importante na produção de IL-6 por meio da ativação de diferentes vias (SAKAMOTO *et al.*, 2003, WILLIAMS *et al.*, 2008).

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que pode estar envolvida na resistência à insulina associada à obesidade. Clinicamente, as concentrações plasmáticas de IL-6 estão aumentadas em indivíduos obesos e são correlacionadas positivamente com a adiposidade (ESPOSITO *et al.*, 2003, HIVERT *et al.*, 2008). Adicionalmente, concentrações plasmáticas de IL-6 estão aumentadas em pacientes com diabetes do tipo 2 (PRADHAN *et al.*, 2001). Estima-se que aproximadamente um terço do total de IL-6 circulante é produzido no tecido adiposo (FRIED *et*

al., 1998), então é plausível que a secreção aumentada desta interleucina na condição de obesidade contribua significativamente para a disfunção metabólica local e sistêmica.

Um dos principais efeitos da IL-6 é a indução da secreção hepática de PCR (SINGH e NEWMAN, 2011), a qual é reconhecida como um marcador da inflamação, além de um fator de risco independente para complicações cardiovasculares (RIDKER, 2003). De fato, existe uma forte relação entre o conteúdo de IL-6 no tecido adiposo e concentrações circulantes de ambas IL-6 e PCR (MAACHI *et al.*, 2004). Além disso, o TAB visceral produz maiores quantidades de IL-6 que o TAB subcutâneo (FRIED *et al.*, 1998), o que poderia explicar parcialmente a maior relação entre depósitos centrais de lipídeos e risco cardiovascular. A produção aumentada de IL-6 poderia afetar diretamente o metabolismo hepático induzindo a secreção de VLDL e a hipertrigliceridemia, já que o TAB visceral está conectado diretamente ao fígado pela veia porta (NONOGAKI *et al.*, 1995).

É importante também destacar que o aumento de gordura no TA da região visceral está mais relacionada ao desenvolvimento das várias comorbidades endócrino-metabólicas, especialmente doenças cardiovasculares e diabetes do tipo 2 (KANHAI *et al.*, 2012). Em 1956, Vague já associava distúrbios metabólicos como hiperuricemia, dislipidemia e alterações do metabolismo glicêmico ao padrão androide, ou seja, à maior deposição da gordura na porção superior do corpo, especialmente região abdominal/visceral (VAGUE, 1956). Assim, a obesidade visceral foi estabelecida como parte de um fenótipo complexo incluindo disfunção de armazenamento de tecido adiposo e acumulação ectópica de triglicerídeos em vários locais, incluindo o fígado (TCHERNOF e DESPRÉS, 2013).

2.4 Restrição calórica, lipídeos dietéticos, obesidade e inflamação

De maneira geral a obesidade é o resultado do excesso da ingestão energética, sendo que a quantidade de energia necessária para manter o peso corporal estável varia de acordo com o gasto energético (FIELD, 2014). Basicamente, o excesso de ingestão energética em relação ao gasto, induz ao acúmulo de energia na forma de triglicerídeos no tecido adiposo, o que por sua vez, leva ao aumento do tamanho dessas células (hipertrofia) e, ou, seu número (hiperplasia) e, em última instância às disfunções metabólicas e imunológicas do tecido adiposo que se tornam sistêmicas e predisõem a inúmeras doenças (HOPKINS e BLUNDELL, 2016).

Neste contexto, diversos tipos de dietas têm sido utilizados para promover a perda de peso, com o objetivo de reduzir os estoques de gordura corporal e atenuar os efeitos imuno-metabólicos adversos, locais e sistêmicos (VIEIRA *et al.*, 2009; OWAN *et al.*, 2011). De

maneira simplista, a indução do balanço energético negativo, por meio da restrição calórica, induziria a perda de peso e, conseqüentemente, causaria melhorias imuno-metabólicas associadas ao excesso de adiposidade (HOPKINS e BLUNDELL, 2016).

É neste contexto que se inserem as dietas de restrição calórica (RC). Essas dietas, que são amplamente utilizadas nas terapias de emagrecimento, caracterizam-se pela redução na ingestão de calorias em relação ao gasto, priorizando uma distribuição de macronutrientes considerada adequada (WHO, 2004, ABESO, 2009). Nelas, a RC é feita individualmente, com base nas informações de ingestão e gasto energético de cada indivíduo, de modo a promover um balanço energético negativo e uma perda de peso dentro de metas pré-estabelecidas e consideradas saudáveis (ABESO, 2009). Assim, se houver balanço energético negativo, o indivíduo perde peso. Entretanto, isto significa perda de massa de tecido adiposo e também de massa magra, o que leva a uma redução subsequente do gasto energético basal, induz a um aumento do apetite, entre outros efeitos, e contribui significativamente para a não adesão aos planos alimentares (PADOVANI *et al.*, 2006). Então, sustentar o peso perdido é um desafio.

Além disso, os efeitos da RC na inflamação crônica de baixo grau ainda são incertos. Em geral, muitos trabalhos apontam que ela reduz as concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α , IL-6 e PCR, e aumenta a produção de produtos anti-inflamatórios, além de melhorar a sensibilidade à insulina em indivíduos obesos (CASTELLO *et al.*, 2010, KALUPAHANA *et al.*, 2011, WASINSKI *et al.*, 2013, SEVERI *et al.*, 2013, RUTH *et al.*, 2013). Outros estudos descrevem poucos ou ausência de alguns efeitos na resposta inflamatória crônica, apesar da perda de peso, em humanos e modelos animais (SHARMAN *et al.*, 2004, FORSYTHE *et al.*, 2008).

Assim, o impacto de intervenções dietéticas com foco na melhora da inflamação induzida pela obesidade, ainda carece de esclarecimentos (KIEN *et al.*, 2009). Neste contexto, os lipídeos dietéticos são importantes moduladores da resposta inflamatória e, portanto, poderiam impactar diferencialmente nas dietas de RC, conforme suas variações, tanto em quantidade quanto em qualidade (JELLEMA *et al.*, 2004, PLAT *et al.*, 2007).

Dentro desta perspectiva, ênfase tem sido dada à composição em ácidos graxos das dietas de RC, no contexto da inflamação (BASU *et al.*, 2006; DUE *et al.*, 2008; SACKS *et al.*, 2009; HAN *et al.*, 2010). Desta forma, ácidos graxos saturados (SFA), poli-insaturados (PUFA), e, especificamente os ácidos graxos PUFA das famílias n-3 e n-6, tem recebido mais atenção (CALDER, 2006).

Os SFA, presentes em abundância nas gorduras de origem animal, têm recebido atenção devido à sua habilidade de influenciar processos pró-inflamatórios na obesidade induzida por

dietas hiperlipídicas (ENOS *et al.*, 2013). Tem sido demonstrado, em estudos *in vitro*, que macrófagos expostos a SFA, aumentaram a expressão de genes e a secreção de citocinas pró-inflamatórias (ex. TNF- α e IL-6) (KEWALRAMANI *et al.*, 2011). A exposição de miotubos ou adipócitos ao ácido palmítico (SFA, 16:0), por exemplo, aumentou a expressão de mRNA para IL-6 e subsequente produção dessa citocina, possivelmente via ativação do *nuclear factor-kB* (NF-kB) (WEISBERG *et al.*, 2003, AJUWON e SPURLOCK, 2005).

Monócitos são ativados diretamente por SFA, especialmente ácido láurico (SFA, 12:0) via *tool-like receptor-4* (TLR-4) e por esse mecanismo induz a atividade do NF-kB (LEE *et al.*, 2003; WEATHERILL *et al.*, 2005). Fernández-Real *et al.* (2003) observaram que a concentração sérica de SFA em indivíduos com excesso de peso foi positivamente associada com as de IL-6 e PCR, bem como a razão SFA: n-6 ou n-3. Entretanto, mais recentemente, tem sido sugerido que os efeitos deletérios dos SFA no risco cardiometabólico dependem, não só da quantidade, mas do tipo de SFA que está em excesso na dieta (SACKS *et al.*, 2009; FATTORE *et al.*, 2014). Por exemplo, na meta-análise realizada por Fattore *et al.* (2014) a dieta com ácido palmítico (SFA, 16:0) promoveu valores significativamente menores para os biomarcadores colesterol total, LDL, e HDL comparada com dietas contendo os SFA mirístico (14:0) e láurico (12:0). Isto sugere influência do tipo do ácido graxo da dieta no desenvolvimento das doenças cardiovasculares.

Dentre os PUFA, os ácidos α -linoleico (18:2, n-6) e α -linolênico (18:3, n-3) representam aproximadamente 95% dos PUFA nas dietas ocidentais e estão presentes em abundância nos óleos vegetais. *In vitro* tem sido demonstrado que esses ácidos graxos suprimem efeitos pró-inflamatórios em monócitos/macrófagos (SNODGRASS *et al.*, 2013) e afetam favoravelmente a secreção de citocinas anti-inflamatórias por essas células.

No entanto, a razão n-6:n-3 parece ser importante para esses e outros efeitos (CALDER, 2002). Nas dietas ocidentais, o α -linoleico está presente na proporção de 10 vezes mais que o α -linolênico. O ácido graxo α -linoleico é precursor do ácido graxo araquidônico (20:4, n-6), que por sua vez, é substrato para a síntese de eicosanoides pró-inflamatórios. Assim, tem sido hipotetizado que ingestão dietética elevada de ácido linoleico em relação ao linolênico modula a intensidade e a duração da inflamação (CALDER, 2002). Entretanto, as evidências disponíveis ainda não conduziram a um consenso. Fernández-Real *et al.* (2003) observaram que a concentração total de PUFA n-6 no soro de indivíduos com excesso de peso foi inversamente associada com as concentrações de IL-6, mas não com as de PCR. A razão SFA:PUFAS n-6 dos lipídeos séricos e fosfolipídeos plasmáticos de indivíduos com sobrepeso foi associada positivamente com concentrações de IL-6, mas não com de PCR (FERRUCCI *et al.*, 2006).

O ácido α -linolênico é substrato para a produção dos ácidos docosahexaenoico (DHA) e eicosapentaenoico (EPA), os quais por sua vez, são substratos para a síntese de mediadores anti-inflamatórios. O aumento do consumo desses ácidos graxos resulta no aumento da sua proporção nas membranas celulares com concomitante redução do ácido araquidônico. Então, menos substrato para a síntese dos eicosanoides derivados deste ácido graxo (araquidônico) estará disponível (YAQOOB *et al.*, 2000). Assim, os PUFA n-3 podem controlar a geração de eicosanoides pró-inflamatórios e favorecer a geração daqueles anti-inflamatórios. Além disso, reduzem a expressão de moléculas de adesão celular e a síntese de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (CALDER, 2002, CALDER, 2006).

2.4.1 Associação entre restrição calórica com dieta hiperlipídica na inflamação da obesidade

A RC é reconhecida com uma estratégia não farmacológica recomendada para reduzir a obesidade (COKER *et al.*, 2009). Entretanto, pouco ainda é conhecido sobre seus efeitos nas respostas inflamatórias do tecido adiposo. Apesar da sua importância sobre a redução do peso corporal ser inquestionável, o consumo de dieta saudável requer mudanças de estilo de vida, as quais muitos indivíduos não conseguem efetuar. Então, é importante investigar se a RC é capaz de promover mudanças expressivas nas respostas proinflamatórias da obesidade, mesmo em um contexto dietético hiperlipídico (WASINSKI *et al.*, 2013).

À luz do conhecimento atual, ainda são poucas as investigações neste contexto. Petro *et al.* (2004), avaliaram os efeitos de uma dieta hipolipídica (11% das calorias provenientes de gordura) em comparação a uma dieta hiperlipídica (58% das calorias provenientes de gordura) e à restrição calórica com a dieta hiperlipídica, no desenvolvimento do diabetes e da obesidade em camundongos. A restrição calórica foi promovida conforme as calorias ingeridas diariamente pelos animais que receberam dieta hipolipídica. Esses autores concluíram que a RC com a dieta hiperlipídica, atenuou o ganho de peso e marcadores do diabetes do tipo 2 e da obesidade, em comparação ao grupo com dieta hiperlipídica, mas não foi capaz de prevenir o desenvolvimento dessas enfermidades.

Kalupahana *et al.* (2011) investigaram se a perda de peso devido à RC com dieta hiperlipídica era acompanhada com melhorias em marcadores metabólicos e na inflamação tecidual. Para isso, induziram a obesidade em camundongos C57BL/6 com oito semanas de idade por quatro meses, por meio de uma dieta hiperlipídica (45% das calorias provenientes de gordura). A RC de 30% com a dieta hiperlipídica, nos últimos dois meses diminuiu a

concentração plasmática da insulina de jejum e o *Índice de Avaliação da Homeostase da Insulina* (HOMA-IR), reduziu triglicerídeos plasmáticos e melhorou a esteatose hepática, em comparação com a dieta hiperlipídica. No entanto, os resultados para marcadores da inflamação crônica foram controversos. A RC com dieta hiperlipídica reduziu a expressão de genes relacionados à adesão celular, interação receptor citocina/citocina e vias de degradação do retículo endoplasmático. Por outro lado, não apresentou efeito nas concentrações circulantes de ácidos graxos não esterificados e adiponectina, que se mantiveram altas e baixas respectivamente, em ambos os regimes (hiperlipídico e hiperlipídico com RC) comparado com o regime controle (hipolipídico, 20% das calorias provenientes de gordura). As respostas na secreção de citocinas no tecido adiposo epididimal também foram controversas. A RC com dieta hiperlipídica reduziu a MCP-1, a IL-2 e o inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1), mas não afetou várias outras citocinas, tais como IL-6, IL-1 β e IFN- γ .

Wang *et al.* (2011) investigaram os efeitos da perda de peso corporal induzida por uma dieta hipolipídica (12,7% das calorias provenientes de gordura) ou pela RC com dieta hiperlipídica (42% das calorias provenientes de gordura) em marcadores teciduais e sistêmicos da inflamação em camundongos obesos. Após a indução da obesidade (8 semanas), a perda de peso foi induzida substituindo a dieta hiperlipídica por dieta hipolipídica em regime *ad libitum* para um grupo de animais e pela restrição de calorias com dieta hiperlipídica em outro grupo, de modo que esses animais alcançassem o mesmo peso corporal atingido pelos animais com dieta hipolipídica *ad libitum*, no dia anterior. Os autores concluíram que a dieta hipolipídica *ad libitum* foi superior em atenuar a inflamação e a esteatose hepáticas, enquanto a RC com dieta hiperlipídica promoveu melhores efeitos na inflamação do tecido adiposo epididimal.

Park *et al.* (2012) investigaram os efeitos da RC com dieta hiperlipídica na inflamação e no estresse oxidativo do fígado e tecido adiposo de ratos. A restrição calórica com dieta hiperlipídica foi de 40% da ingestão do grupo de animais que recebeu dieta hiperlipídica. Esses autores observaram redução nas concentrações séricas de triglicerídeos e colesterol, o restabelecimento da razão leptina/adiponectina aos níveis normais e melhoria na tolerância a glicose, além de redução dos lipídeos hepáticos. Houve também normalização do tamanho e da morfologia dos adipócitos epididimais, além de redução da expressão da PCR e de marcadores do estresse oxidativo neste tecido.

Wasinski *et al.* (2013) compararam os efeitos do exercício físico e da RC de 30% com dieta hiperlipídica (45% das calorias provenientes de gordura), em camundongos C57BL/6 com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (16 semanas), em células imunes residentes do TAB. Ambas as estratégias reduziram o peso corporal dos animais e atenuaram os efeitos deletérios da

inflamação, mas de maneira diferente, o exercício afetou mais a resposta imune inata e a RC, a resposta adaptativa.

Ruth *et al.* (2013) demonstraram, em indivíduos obesos, que a RC (déficit de 500 kcal diárias) com dieta hiperlipídica (60% das calorias provenientes de gordura) por 12 semanas reduziu a concentração sérica de PCR, e aumentou as concentrações de adiponectina e de lipoproteína de alta densidade (HDL), comparada com a RC com dieta hipolipídica (25% das calorias provenientes de gordura). Esses autores sugerem que, em indivíduos de vida livre, a RC com dieta hiperlipídica tenha sido mais favorável à adesão, já que este grupo se aproximou mais da meta de perda de peso determinada para as 12 semanas do estudo (5 a 10%), comparado com o grupo que recebeu a RC com dieta hipolipídica.

Assim, podemos dizer que ainda são bastante controversos os efeitos da RC com dieta hiperlipídica, quando comparados a um regime hipolipídico *ad libitum*. Em conjunto, alguns resultados já citados mostraram que este regime foi efetivo em atenuar ou restabelecer parâmetros da homeostase da glicose, de lipídeos e a esteatose hepática. Além disso, promoveu efeitos positivos na inflamação do tecido adiposo epididimal, reduziu a concentração sérica de PCR, aumentou a de adiponectina, melhorando a razão leptina/adiponectina, reduziu a MCP-1, a IL-2 e o inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1). Ainda, normalizou o tamanho e a forma dos adipócitos epididimais, além de reduzir a expressão de marcadores do estresse oxidativo neste tecido. Em contrapartida, em outros estudos, não foi capaz de prevenir o desenvolvimento do diabetes do tipo 2 e da obesidade, não apresentou efeito nas concentrações circulantes de ácidos graxos não esterificados e de adiponectina e não afetou várias citocinas, tais como IL-6, IL-1 β e IFN- γ .

Diferenças de desfechos podem ter ocorrido, pelo menos em parte, por causa de diferenças metodológicas em relação ao modelo de estudo (animal x humano) utilizado, magnitude da RC, forma de indução da RC, duração dos experimentos/ensaio, e momento das intervenções (idade dos animais, durante desenvolvimento da obesidade ou após), marcadores avaliados, dentre outros. De todo modo, desfechos ainda são controversos até o momento.

Assim, o estudo dos efeitos da RC com dieta hiperlipídica pode contribuir para o melhor entendimento do papel dessas dietas em relação às dietas de composição considerada “normal” nas respostas inflamatórias teciduais e sistêmicas. Dado o envolvimento ainda incerto de diferentes ácidos graxos na instalação, manutenção e, ou piora da inflamação crônica da obesidade, poderá também contribuir no futuro para o estabelecimento de alvos dietéticos terapêuticos para o tratamento da obesidade. O uso de modelos animais é crucial, já que a

avaliação desses efeitos diretamente no tecido adiposo, local onde se desenvolve o processo, torna-se mais viável.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos da perda de peso corporal induzida por dieta hipolipídica *ad libitum* e pela restrição calórica com dieta hiperlipídica na inflamação do tecido adiposo de camundongos obesos.

3.2 Específicos:

1. Avaliar marcadores relacionados à composição corporal e à inflamação sistêmica;
2. Determinar as concentrações de adipocinas e de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo retroperitoneal;
3. Avaliar a morfometria dos adipócitos e a infiltração de células inflamatórias do tecido adiposo retroperitoneal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ensaio Biológico

4.1.1 Animais e condições experimentais

Foram utilizados 52 camundongos C57BL/6 machos, com idade de aproximadamente 12 semanas, alojados individualmente em caixas de polipropileno. O experimento foi conduzido no Laboratório de Ensaios Biológicos (LEB) do Centro Integrado de Pesquisas e Pós-Graduação em Saúde (CIPq) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), em sala climatizada (22°C) e em ciclo claro-escuro de 12 horas, invertido ao ciclo regular (luzes ligadas das 18:00 às 06:00hs).

Os animais foram mantidos, manipulados e eutanasiados de acordo com os princípios éticos para uso de animais de laboratório do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (www.cobea.org.br). O protocolo do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais Experimentais – CEUA/UFVJM. (Protocolo n. 018/2014).

4.1.2 Dietas experimentais

Foram formuladas dietas purificadas, tendo como base as recomendações para proteína e microelementos do *American Institute of Nutrition* (REEVES *et al.*, 1993) com modificações baseadas na Research Diets (www.researchdiets.com). As dietas foram rotuladas em Controle hipolipídica do inglês - *Low-fat* (LF): dieta hipolipídica, com baixo teor de lipídeos e fonte de gordura o óleo de soja; e dieta Controle hiperlipídica do inglês - *high-fat* (HF): dieta hiperlipídica com composição ajustada para tornar-se com elevado teor de lipídeos provenientes da banha de porco (Tabela 1). Esta dieta teve aproximadamente 11,5 vezes mais SFA que a dieta LF (Tabela 2). O conteúdo de micronutrientes foi similar entre as duas dietas (Tabela 1).

Tabela 1: Composição das dietas experimentais

Ingredientes	Dietas Experimentais*	
	LF (g)	HF (g)
Caseína	200,0	200,0
Amido dextrinizado	125,0	125,0
Sacarose	68,8	68,8
Celulose microfina	50,0	50,0
Óleo de soja	45,0	25,0
Banha de porco	---	245,0
Mix mineral	35,0	35,0
Mix vitaminas	10,0	10,0
L-cistina	3,0	3,0
Bitartarato de colina	2,0	2,0
Amido de milho	506,2	0,0
Macronutrientes	LF(kcal%)	HF(kcal%)
Proteína	20,0	20,0
Carboidratos	70,0	20,0
Lipídeos	10,0	60,0
Densidade calórica (kcal/g)	3,83	5,24

*LF= Dieta baseada nas recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN93G) para proteína e microelementos, com baixo teor de lipídeos e fonte óleo de soja. HF= dieta com composição ajustada para tornar-se com elevado teor de lipídeos provenientes da banha de porco (hiperlipídica). Cálculo adaptado de Reeves *et al.* (1993) e Research Diets, Inc. (www.researchdiets.com).

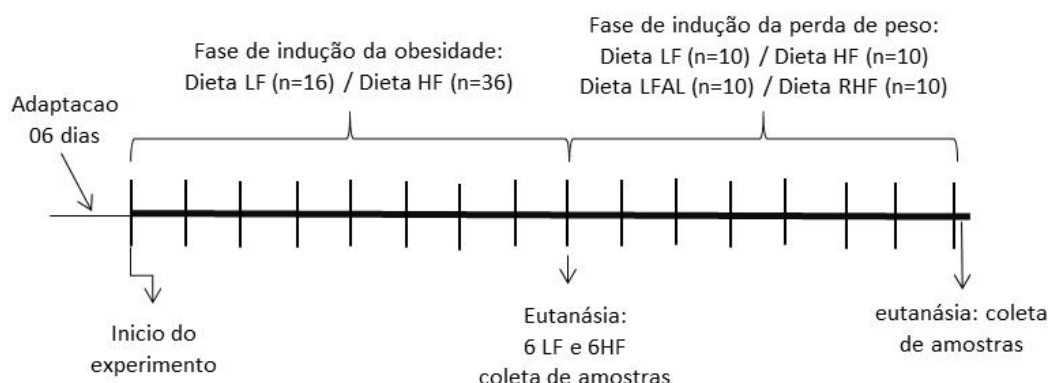
Tabela 2: Composição em ácidos graxos das dietas experimentais (g/Kg)

Fonte/Ácidos graxos	Dietas Experimentais	
	LF	HF
Óleo de soja (g)	45	25
Banha de porco (g)	--	245
Saturados (g)	6,9	81,5
Monoinsaturados (g)	10,5	91,5
Poli-insaturados (g)	26,0	81,5

*LF= Dieta baseada nas recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN93G) para proteína e microelementos, com baixo teor de lipídeos e fonte óleo de soja. HF= dieta com composição ajustada para tornar-se com elevado teor de lipídeos provenientes da banha de porco (hiperlipídica). Calculo adaptado de Reeves *et al.* (1993) e Research Diets, Inc. (www.researchdiets.com).

4.1.3 Desenho experimental

O experimento teve a duração de 15 semanas e foi dividido em duas fases: indução da obesidade e indução da perda de peso, conforme apresentado na Figura 6.

**Figura 6:** Esquema do desenho experimental

Antes do início do experimento, os animais foram alojados individualmente em caixas de polipropileno e alimentados por um período de 01 semana, com acesso *ad libitum* à ração comercial para roedores e água filtrada, com o objetivo de se adaptarem às condições ambientais. Em seguida, foram divididos aleatoriamente em dois grupos para o período de indução da obesidade: Controle hipolipídica (LF, n=16) e Controle *hiperlipídica* (HF, n=36). Ambos tiveram acesso *ad libitum* à água filtrada e às dietas durante este período, o qual teve duração de 08 semanas.

A ingestão alimentar e o peso corporal foram monitorados semanalmente durante todo o período. No penúltimo dia desta fase, seis animais de cada grupo foram sorteados, e submetidos ao jejum noturno (12 horas). Em seguida, foram pesados e anestesiados para a aferição do comprimento naris-ânus. Na sequência, foram eutanasiados por decaptação e amostras de sangue foram coletadas para análises posteriores, além de todo o tecido adiposo mesentérico, epididimal, retroperitoneal, e o fígado, os quais foram processados e mantidos a -80 °C.

Para os demais animais, deu-se início à fase de indução da perda de peso. Para tal, os camundongos do grupo HF foram re-divididos em três grupos (n=10) e, juntamente com os LF (n=10), foram alocados em um dos quatro tratamentos, conforme descrito no Quadro 1. A partir daí todos os animais foram alimentados por mais sete semanas.

Quadro 1 – Distribuição dos grupos experimentais conforme os tratamentos de dietas.

Fase 1*	Fase 2**	Descrição
LF (n=16)	LF (n=10)	Dieta controle hipolipídica – grupo mantido durante todo o experimento com dieta baseada nas recomendações do <i>American Institute of Nutrition</i> (AIN93G), com baixo teor de lipídeos e provenientes do óleo de soja (10% das calorias).
HF (n=36)	HF (n=10)	Dieta controle hiperlipídica – grupo mantido durante todo o experimento com dieta ajustada para tornar-se com elevado teor de lipídeos provenientes da banha de porco (60% das calorias).
	LFAL (n=10)	Dieta LF <i>ad libitum</i> – Grupo submetido a perda de peso pela substituição da dieta HF pela LF em oferta <i>ad libitum</i> , a partir do início da fase de indução da perda de peso.
	RHF (n=10)	Dieta HF com restrição calórica* – Grupo submetido à perda de peso por meio da restrição calórica com dieta HF, de modo a atingir o mesmo peso corporal dos animais LFAL no dia anterior, a partir do início da fase de indução da perda de peso.

*Fase 1= Indução da obesidade; ** Fase 2= Indução da perda de peso

Durante a fase da perda de peso a ingestão alimentar e peso corporal foram monitorados diariamente durante todo o período. No penúltimo dia do experimento os animais foram submetidos ao jejum noturno (12 horas). Em seguida, foram pesados e anestesiados para a aferição do comprimento nariz-anus. Na sequência, foram eutanasiados por decaptação e amostras de sangue foram coletadas para análises posteriores, além de todo o tecido adiposo

mesentérico, epididimal, retroperitoneal, e o fígado, os quais foram processados e mantidos a -80 °C.

4.2 Procedimentos de análises

4.2.1 Ingestão alimentar e calórica, e antropometria

Ingestão alimentar e calórica

Na fase de indução da obesidade, a ingestão alimentar foi monitorada semanalmente e a oferta de dieta foi *ad libitum* para ambos os grupos (LF e HF).

Na fase de indução da perda de peso, os grupos LF e HF continuaram a receber as respectivas dietas *ad libitum*. O grupo LFAL foi submetido à perda de peso pela substituição da dieta HF pela LF *ad libitum*. Nesta fase a ingestão alimentar foi monitorada diariamente. Como a meta de peso corporal para os animais RHF foi o peso corporal atingido pelos animais LFAL no dia anterior, para calcular a restrição calórica deste grupo, procedeu-se da seguinte maneira:

1. No primeiro dia da fase de indução da perda de peso, os animais LFAL foram pareados com os RHF de acordo com seus pesos corporais iniciais na fase (pesos mais próximos);
2. Todos os dias, a ingestão alimentar (g) dos animais LFAL foi aferida;
3. Esses valores foram convertidos em calorias, multiplicando-os pela densidade calórica da dieta do grupo LFAL;
4. Em seguida, foram divididos pela densidade calórica da dieta HF para a obtenção da quantidade desta dieta a ser oferecida aos animais do grupo RHF, compatível com a ingestão calórica dos animais LFAL do dia anterior.

Desta forma, o grupo RHF ingeriu sempre a mesma quantidade de calorias que o grupo LFAL ingeriu no dia anterior. Assim, a meta de perda de peso para cada animal do grupo RHF foi compatível com a ingestão calórica e, hipoteticamente, com o peso corporal atingido no dia anterior do seu par.

A ingestão alimentar total de cada fase foi obtida por meio da somatória das ingestões de toda a fase, indução da obesidade ou indução da perda de peso. A ingestão calórica foi calculada da mesma forma, tendo como base a ingestão absoluta (g) multiplicada pela densidade calórica de cada dieta. A ingestão lipídica foi calculada considerando 10% das calorias da dieta hipolipídica e 60% das calorias da dieta hiperlipídica ingeridas. Em seguida, converteu-se os valores de calorias lipídicas ingeridas em gramas, utilizando-se o fator de Atwater para lipídeos (9 kcal de lipídeos para cada g de lipídeo).

Peso corporal

Os pesos corporais dos animais foram aferidos semanalmente (fase de indução da obesidade) ou diariamente (fase de perda de peso) em balança semi-analítica da marca Uni Bloc e foi calculado o ganho de peso (GP) (ou perda de peso) corporal, tanto para a fase de indução da obesidade quanto para a fase de indução da perda de peso, respectivamente:

$$GP = [\text{peso corporal final do período (g)} - \text{peso corporal inicial do período (g)}].$$

Eficiência energética (CEE)

A habilidade de transformar as calorias consumidas em peso corporal foi determinada nos períodos de indução da obesidade e da perda de peso, por meio do coeficiente de eficiência energética (CEE), utilizando a equação:

$$CEE = \text{ganho de peso total (g)} / \text{ingestão calórica total (kcal)}$$

Pesos absolutos e relativos da gordura visceral e fígado

Após a eutanásia foram retirados o fígado, bem como toda a gordura das regiões mesentérica, retroperitoneal e epididimal de cada animal. Os fígados e as gorduras foram limpos por imersão em solução salina, secos em papel filtro e pesados em balança analítica da marca Shimadzu. Foram utilizados os valores de pesos absolutos de cada compartimento visceral de gordura e do fígado e calculados os pesos relativos (% do peso corporal total), conforme a equação:

$$PR (\%) = (\text{Peso úmido do órgão ou tecido (g)} / \text{Peso corporal final (g)}) \times 100.$$

Índice de Lee (IL)

O índice de Lee foi calculado no último dia de ambas as fases. Para tal, os animais foram pesados, anestesiados com aplicação intraperitoneal de solução de quetamina+xilazina (50mg/kg+10mg/kg, respectivamente). Em seguida, foram posicionados em decúbito dorsal para a aferição do comprimento nariz-ânus por meio de uma régua milimetrada para posterior determinação do Índice de Lee, conforme a equação:

$$IL (\text{g/cm}) = [\text{Raiz cúbica do peso corporal (g)} / \text{comprimento nariz-ânus (cm)}] \times 10$$

Índice de adiposidade (IAd%)

Após a eutanásia, os animais tiveram suas cavidades abdominais abertas para a retirada de toda a gordura das regiões epididimal, retroperitoneal e mesentérica, que foram limpas, imersas em solução salina, secas e pesadas individualmente em balança analítica da marca Shimadzu. Foi calculado o índice de adiposidade (BOUSTANY *et al.*, 2004), conforme a equação:

$$IAd. (\%) = (\text{peso da gordura epididimal} + \text{peso da gordura retroperitoneal} + \text{peso da gordura mesentérica}) / (\text{peso corporal final} - \sum \text{peso da gordura epididimal} + \text{retroperitoneal} + \text{mesentérica}) * 100$$

4.2.2 Concentrações séricas e hepáticas de proteína C reativa (PCR)

Após a eutanásia, o sangue foi imediatamente coletado em tubos sem anticoagulante para obtenção do soro. Para tal, os tubos foram centrifugados a 1000 x g durante 10 minutos e a 4 °C. Após a centrifugação, o soro foi aliqotado em tubos de polipropileno e armazenado a -80°C até o momento das análises. As concentrações séricas de PCR foram determinadas por meio da técnica *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA, utilizando kit apropriado (Mouse C-Reactive Protein/CRP, DuoSet® ELISA kit, R&D Systems) e com auxílio de leitor de microplaca Spectra MAX 190 (Molecular Devices, USA).

Os fígados foram coletados, imersos em solução salina, limpos, secos e pesados individualmente em balança analítica da marca Shimadzu e, posteriormente, armazenados a -80°C até o momento das análises. Para essas análises, as proteínas foram previamente extraídas do tecido por meio de solução de extração (23,4g NaCl a 0,4M, 500µl tween20 a 0,05%, 5g BSA a 0,5%, 17mg PMSF a 0,1 mM) na proporção de 100 mg de tecido/1 ml de solução. A extração foi realizada por maceração em almofariz com pistilo; seguida de centrifugação a 4600 x g/10 min a 4°C. O sobrenadante (extrato proteico) foi coletado, aliqotado em tubos de polipropileno e armazenados a -80°C até o momento das análises.

As concentrações hepáticas de PCR também foram determinadas por meio da técnica de ELISA, utilizando kit apropriado (Mouse C-Reactive Protein/CRP, DuoSet® ELISA kit, R&D Systems) e com auxílio de leitor de microplaca Spectra MAX 190 (Molecular Devices, USA).

As concentrações séricas e hepáticas da PCR foram expressas em pg/mg de proteína total do soro ou tecido hepático. A concentração total de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976).

4.2.3 Concentrações de adipocinas e citocinas do tecido adiposo retroperitoneal

Para essas análises, as proteínas foram previamente extraídas do tecido por meio de solução de extração (23,4g NaCl a 0,4M, 500µl tween20 a 0,05%, 5g BSA a 0,5%, 17mg PMSF a 0,1 mM) na proporção de 100 mg de tecido/1 ml de solução. A extração foi realizada por maceração em almofariz com pistilo; seguida de centrifugação a 4600 x g/10 min a 4°C. O sobrenadante (extrato proteico) foi coletado, aliquotado em tubos de polipropileno e armazenados a -80°C até o momento das análises.

Concentrações de leptina, adiponectina e razão leptina/adiponectina

As concentrações de leptina e de adiponectina foram determinadas por meio da técnica de ELISA, utilizando kits de reagentes apropriados (Mouse Leptin DuoSet® ELISA e Mouse Adiponectin/Acrp30 DuoSet® ELISA kits, R&D Systems) e com auxílio de leitor de microplacas Spectra MAX 190 (Molecular Devices, USA).

As concentrações teciduais dessas proteínas foram expressas em pg/mg de proteína total do tecido. A concentração total de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976).

A partir dos valores obtidos para leptina e adiponectina, foi calculada a razão leptina/adiponectina conforme Finucane, *et al.* (2009).

Concentrações de citocinas pró-inflamatórias

As concentrações das citocinas IL-6, TNF e MCP-1 foram determinadas pelo método de *Cytometric Bead Array* – CBA, utilizando kit apropriado (BDBioscience) e o citômetro BD FACSCanto II. Os resultados foram expressos em pg/ml.

4.2.4 Análises histomorfométricas e infiltração de células inflamatórias no tecido adiposo retroperitoneal

Após a coleta e processamentos, secções do tecido adiposo retroperitoneal foram fixadas com formalina tamponada 10% e submetidas à desidratação com gradiente crescente de álcool (70, 80, 90 e 100%). Os tecidos foram então submetidos ao processo de diafanização, no qual o álcool presente nos tecidos foi substituído por xilol, e logo após o processo de impregnação, em que o xilol foi substituído por parafina fundida em estufa a 60°C. Foi feita a montagem dos blocos, dos quais foram retirados cortes de 5 µm, com intervalos de 20 cortes, utilizando um micrótomo (Lupetec MRP09). Foram confeccionadas as lâminas e os cortes foram corados de

acordo com a técnica de hematoxilina-eosina (HE). Foram utilizados o software ImageJ 1.51n e câmera acoplada ao microscópio da marca Zeiss na avaliação das lâminas.

A hipertrofia dos adipócitos foi avaliada pela determinação dos diâmetros das células. Para tal, os campos foram fotografados utilizando uma câmera digital acoplada a um microscópio, em uma ampliação de 400 vezes para todos os cortes. Foram medidas as áreas de 50 adipócitos por animal para avaliar a hipertrofia (diâmetro).

A presença de células inflamatórias e a porcentagem de áreas com células inflamatórias foram avaliadas conforme descrito por Yoshimura *et al.* (2016). Para tal, diferentes regiões de interesse com áreas de $1180 \times 885,23 \mu\text{m}^2$ foram selecionadas de cada slide e fotografadas com aumento de 100x. As imagens foram obtidas usando o software ImageJ 1.51n. Considerando que núcleos de células inflamatórias ficam intensamente corados pela hematoxilina, foi possível quantificar sua área relativa modificando o processamento da imagem. Desta forma, inicialmente a fotomicrografia foi convertida em imagem em preto e branco de 32 bits, a qual foi utilizada como *input* para dois ajustes diferentes. O primeiro foi para eliminar áreas não povoadas por células (converter em branco). As áreas pretas remanescentes foram quantificadas e os resultados foram expressos como áreas totais. O segundo ajuste foi feito para preservar áreas envolvidas por células inflamatórias. Essas áreas foram também quantificadas e normalizadas pela área total, resultando na porcentagem de área com células inflamatórias.

Como essas análises foram fruto de ajustes, cada imagem foi manualmente examinada para que resíduos, bem como porções de imagem que não pertencessem às células ou tecidos de interesse, fossem cuidadosamente eliminadas dos cálculos. No mínimo 10 campos dos slides originais foram quantificados para cada amostra (YOSHIMURA *et al.*, 2016).

4.2.5 Análises estatísticas

O experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram expressos em médias \pm erro padrão. A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para comparação entre os grupos de dietas foi utilizada análise de variância, one-way ANOVA, e teste de Tukey, a posteriori sempre que necessário. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Para todas as análises, foi utilizado o software Statistica v.10.0. Os gráficos foram elaborados utilizando o software SigmaPlot 12.0.

5 RESULTADOS

No início do período experimental, os pesos corporais dos animais eram homogêneos. Ao final da fase de indução da obesidade, os animais que receberam dieta HF apresentaram pesos corporais maiores que os LF ($p < 0,05$, Tabela 3). Não houve diferença para a ingestão alimentar entre os grupos. No entanto, os animais HF ingeriram mais calorias e tiveram maior eficiência energética, o que explica os maiores pesos corporais, IL e IAd% ($p < 0,05$) para este grupo (Tabela 3). Adicionalmente, é interessante observar que, apesar de o IL para os animais HF ter sido apenas 4,23% superior aos LF, o IAd% foi 75,36% superior, sendo este, representativo da adiposidade visceral. As dosagens da PCR, tanto as séricas quanto as hepáticas, foram superiores para os animais HF ($p < 0,05$, Tabela 3).

Tabela 3: Características gerais dos animais experimentais durante a fase de indução da obesidade.

Características	Grupos experimentais	
	LF (n=12)	HF (n=36)
Peso corporal inicial (g)	24,47±0,30	24,85±0,20
Peso corporal final (g)	27,27±1,56	33,99*±3,32
Ingestão alimentar diária (g/dia)	3,26±0,21	3,98±1,52
Ingestão calórica diária (Kcal/dia)	12,49±0,82	16,14*±0,99
Eficiência energética (g/Kcal)	0,003±0,003	0,011*±0,004
IL (g/cm ³)	3,07±0,03	3,20*±0,02
IAdip (%)	2,72±0,08	4,77*±0,08
PCR soro (pg/mg proteína)	12,27±3,72	23,26*±5,96
PCR fígado (pg/mg proteína)	8,10±4,41	11,31*±5,48

IL=Índice de Lee, IAdip(%) = Índice de adiposidade, PCR = proteína C reativa. Valores expressos em média ± erro padrão. *Indica diferença significativa por *One Way* ANOVA ($p < 0,05$). LF = dieta controle hipolipídica; HF = dieta controle hiperlipídica.

No início da fase de indução da perda de peso, os animais HF, LFAL e RHF apresentavam maiores pesos corporais comparados com os LF ($p < 0,05$, Tabela 4). Ao final desta fase, os grupos LFAL e RHF tiveram pesos corporais semelhantes entre si e se igualaram aos LF, sendo estes inferiores aos HF. No entanto, quando se analisou a perda de peso corporal, observou-se que o grupo RHF perdeu menos peso que o grupo LFAL ($p < 0,05$, Tabela 4).

Em relação à ingestão alimentar absoluta, todos os grupos diferiram entre si, sendo a maior ingestão para o grupo LFAL, seguido, em ordem decrescente pelo LF > HF > RHF ($p<0,05$, Tabela 4). Por outro lado, o grupo HF foi o que ingeriu mais calorias ($p<0,05$), sendo que os grupos LFAL e RHF não diferiram entre si, foram inferiores ao HF e ainda se mantiveram superiores ao LF ($p<0,05$, Tabela 4). Adicionalmente, os animais dos grupos LF e LFAL tiveram ingestão lipídica semelhante (g e kcal), enquanto que os RHF tiveram ingestão inferior aos HF e superior aos LF e LFAL ($p<0,05$, Tabela 4). Como esperado, a eficiência energética do grupo HF foi superior à do LF. Para os animais submetidos à perda de peso, consideramos as eficiências energéticas negativas como eficiência em perder peso e, neste caso, os resultados indicaram que os animais LFAL foram mais eficientes em perder peso que os RHF, o que concordou com os deltas de perda de peso ($p<0,05$, Tabela 4).

Tabela 4: Características gerais dos animais experimentais na fase de indução da perda de peso.

Características	Grupos experimentais (n=10)			
	LF	HF	LFAL	RHF
Peso corporal inicial (g)	27,27 ^b ±0,65	34,46 ^a ±1,01	33,70 ^a ±0,78	33,71 ^a ±0,87
Peso corporal final (g)	29,02 ^b ±0,58	40,94 ^a ±1,41	28,63 ^b ±0,81	30,55 ^b ±0,75
Ganho/perda de peso (g)	1,75 ^b ±0,97	4,48 ^a ±1,50	(-)5,08 ^d ±1,20	(-)3,16 ^c ±1,56
Ingestão alimentar (g/dia)	3,31 ^b ±0,19	2,96 ^c ±0,37	3,67 ^a ±0,13	2,68 ^d ±0,04
Ingestão calórica (kcal/dia)	12,69 ^c ±0,73	15,54 ^a ±1,95	14,06 ^b ±0,50	14,07 ^b ±0,19
Ingestão lipídica (g/dia)	0,14 ^c ±0,01	1,66 ^a ±0,22	0,16 ^c ±0,01	0,94 ^b ±0,01
Ingestão calórica lipídica (kcal/dia)	1,27 ^c ±0,07	14,94 ^a ±1,95	1,41 ^c ±0,05	8,44 ^b ±0,12
CEE (g/kcal)*	0,003 ^b ±0,002	0,007 ^a ±0,002	(-)0,008 ^d ±0,002	(-)0,005 ^c ±0,002

*Coeficiente de eficiência energética (g/kcal). LF = dieta controle hipolipídica; HF = dieta controle hiperlipídica; LFAL = dieta hipolipídica *ad libitum*; RHF = dieta hiperlipídica com restrição calórica. Valores expressos em média±erro padrão. Médias seguidas por letras diferentes (linha) diferem entre si pelo Teste Tukey ($p<0,05$).

Observamos também diferenças nos pesos dos compartimentos de gordura visceral avaliados. Para a gordura retroperitoneal, houve redução dos pesos absolutos e de maneira semelhante, para os grupos LFAL e RHF em comparação ao HF, sendo que se igualaram ao LF. No entanto, após relativização pelo peso corporal, o grupo RHF apresentou valores intermediários entre LFAL e HF. O mesmo foi observado para a gordura epididimal em ambas as análises absoluta e relativa ($p<0,05$, Tabela 5). Para a mesentérica, os grupos LFAL e RHF tiveram redução dos pesos, igualando-se aos LF ($p<0,05$, Tabela 5), tanto para peso absoluto quanto para relativo.

Para os pesos dos fígados, no grupo LFAL houve redução, igualando ao LF ($p<0,05$). No grupo RHF não houve redução. No entanto, após relativização, o grupo LFAL se manteve superior ao LF e inferior aos HF e RHF ($p<0,05$, Tabela 5).

Tabela 5: Pesos absolutos (g) e relativos (% peso corporal total) do fígado e da gordura dos compartimentos retroperitoneal, epididimal e mesentérico dos animais experimentais ao final da fase de indução da perda de peso.

Tecido	Grupos experimentais (n=10)			
	LF	HF	LFAL	RHF
Retroperitoneal (g)	0,21 ^b ±0,02	0,67 ^a ±0,29	0,18 ^b ±0,16	0,31 ^b ±0,17
Retroperitoneal (%)	0,71 ^c ±0,65	1,60 ^a ±0,59	0,65 ^c ±0,62	1,01 ^b ±0,49
Epididimal (g)	0,39 ^b ±0,15	1,36 ^a ±0,51	0,41 ^b ±0,13	0,81 ^b ±0,42
Epididimal (%)	1,34 ^c ±0,45	3,29 ^a ±1,11	1,48 ^c ±0,54	2,62 ^b ±1,24
Mesentérico (g)	0,36 ^b ±0,09	0,90 ^a ±0,43	0,37 ^b ±0,06	0,48 ^b ±0,15
Mesentérico (%)	1,23 ^b ±0,26	2,15 ^a ±0,89	1,32 ^b ±0,21	1,46 ^b ±0,47
Fígado (g)	0,96 ^b ±0,07	1,46 ^a ±0,26	1,00 ^b ±0,05	1,32 ^a ±0,368
Fígado (%)	3,03 ^c ±0,27	4,67 ^a ±0,91	3,51 ^b ±0,29	4,32 ^a ±1,11

LF = dieta controle hipolipídica; HF = dieta controle hiperlipídica; LFAL = dieta hipolipídica *ad libitum*; RHF = dieta hiperlipídica com restrição calórica. Resultados apresentados em média±erro padrão. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pela *One Way* ANOVA e Teste Tukey ($p<0,05$).

Adicionalmente, os animais RHF apresentaram valores de IL semelhantes aos LFAL, sendo ambos também semelhantes aos LF, e menores que os HF. ($p<0,05$, Figura 7A). Para o índice de adiposidade, diferença significativa foi detectada entre os grupos LFAL e RHF. Neste caso, os animais RHF tiveram adiposidade visceral maior que os LFAL e menor que os HF ($p<0,05$, Figura 7B). Adicionalmente, as concentrações séricas e hepáticas da PCR foram reduzidas para o grupo LFAL a valores semelhantes ao LF. No grupo RHF, esta redução foi significativa em comparação ao grupo HF ($p<0,05$), não atingindo valores semelhantes ao grupo LF somente para PCR hepática. Não houve redução na concentração de PCR sérica para o grupo RHF ($p>0,05$, Figura 7C).

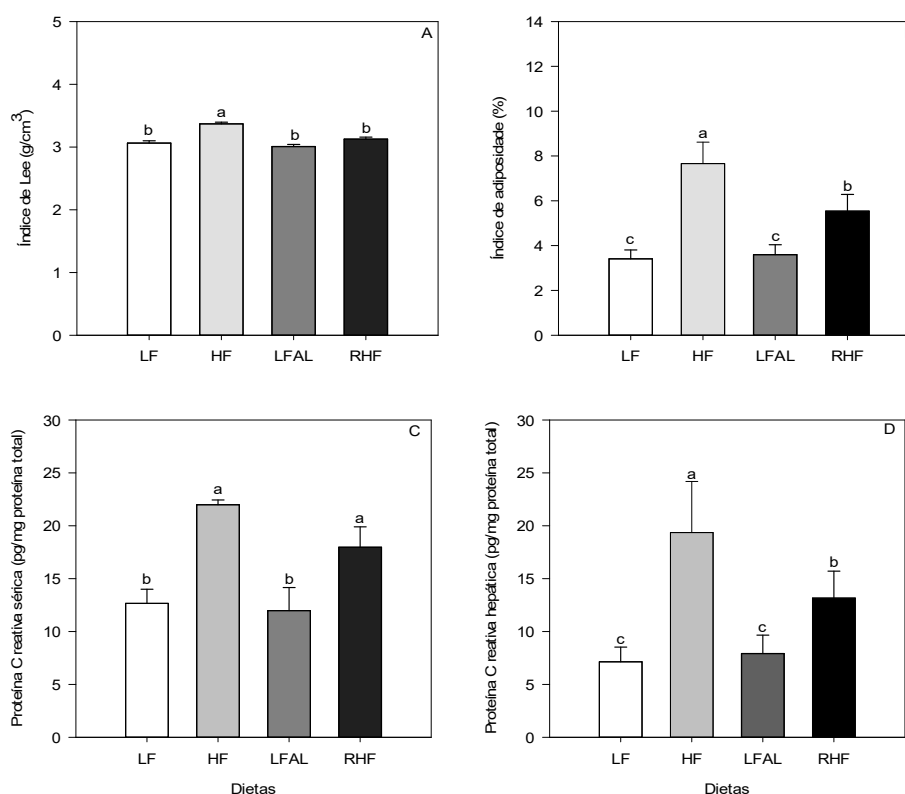


Figura 7: Índice de Lee (A), Índice de adiposidade (B), concentrações séricas (C) e hepáticas (D) de proteína C reativa (PCR) dos animais experimentais ao final da fase de indução da perda de peso. LF = dieta controle hipolipídica; HF = dieta controle hiperlipídica; LFAL = dieta hipolipídica *ad libitum*; RHF = dieta hiperlipídica com restrição calórica. Resultados apresentados em média±erro padrão. Barras seguidas por letras diferentes diferem entre si pela One Way ANOVA e Teste Tukey ($p < 0,05$).

Diante dos achados sistêmicos, nós investigamos as concentrações de adipocinas relacionadas com o processo inflamatório da obesidade, diretamente no tecido adiposo retroperitoneal. Este compartimento foi escolhido pela facilidade de coleta, independente de o animal estar obeso ou não. Além disso, é também um dos compartimentos viscerais de roedores (CHUSYD *et al.*, 2016), correspondendo, em humanos ao tamanho aproximado de 1 a 20 kg (FRAYN, 2007). Em camundongos e ratos, a remoção cirúrgica do tecido adiposo retroperitoneal, melhorou a sensibilidade à insulina, reduziu a tumorigênese e melhorou a longevidade (GABRIELY *et al.*, 2002, BARZILAI *et al.*, 1999, MUZUMDAR *et al.*, 2008), evidenciando a relação direta entre este tecido e as repercussões negativas da obesidade.

Neste caso, apesar de termos observado efeitos diferenciais na adiposidade visceral entre os grupos LFAL e RHF, houve redução semelhante ($p = 0,1386$) nas concentrações teciduais de

leptina para esses grupos, os quais se igualaram ao LF ($p < 0,05$, Figura 8A). Já para a adiponectina, apenas o grupo LFAL conseguiu restabelecer valores semelhantes ao LF (Figura 8B). O grupo RHF manteve-se com concentrações baixas dessa adipocina, semelhantes ao HF (Figura 8B). A razão leptina/adiponectina foi similar entre LFAL e LF, o grupo RHF apresentou valor intermediário e o grupo HF o maior valor ($p < 0,05$, Figura 8C).

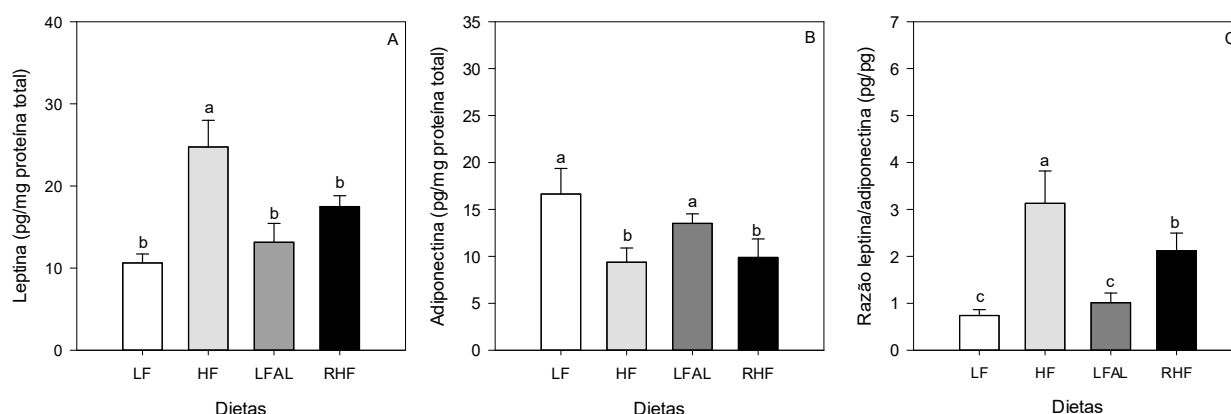


Figura 8: Concentrações de leptina (A), adiponectina (B) do tecido adiposo retroperitoneal e razão leptina/adiponectina (C) dos animais experimentais ao final da fase de indução da perda de peso. LF = dieta controle hipolipídica; HF = dieta controle hiperlipídica; LFAL = dieta hipolipídica *ad libitum*; RHF = dieta hiperlipídica com restrição calórica. Barras seguidas por letras diferentes diferem entre si pela One Way ANOVA e Teste Tukey ($p < 0,05$).

Dados os efeitos diferenciais dos regimes na adiposidade visceral e na concentração de adipocinas, em especial de adiponectina, nós também determinamos as concentrações de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF e MCP-1) no tecido adiposo retroperitoneal. É importante ressaltar inicialmente, que as citocinas TNF e MCP-1 não foram detectadas pelo método de análise para o grupo LF.

A IL-6 foi reduzida no grupo LFAL em comparação com os grupos HF e RHF, mas não retornou a valores semelhantes ao LF ($p < 0,05$, Figura 9A). O TNF foi reduzido apenas no grupo LFAL ($p < 0,05$, Figura 9B). A MCP-1 não diferiu entre os grupos HF e RHF, sendo que o grupo LFAL teve sua concentração reduzida em relação a esses dois outros ($p < 0,05$, Figura 9C).

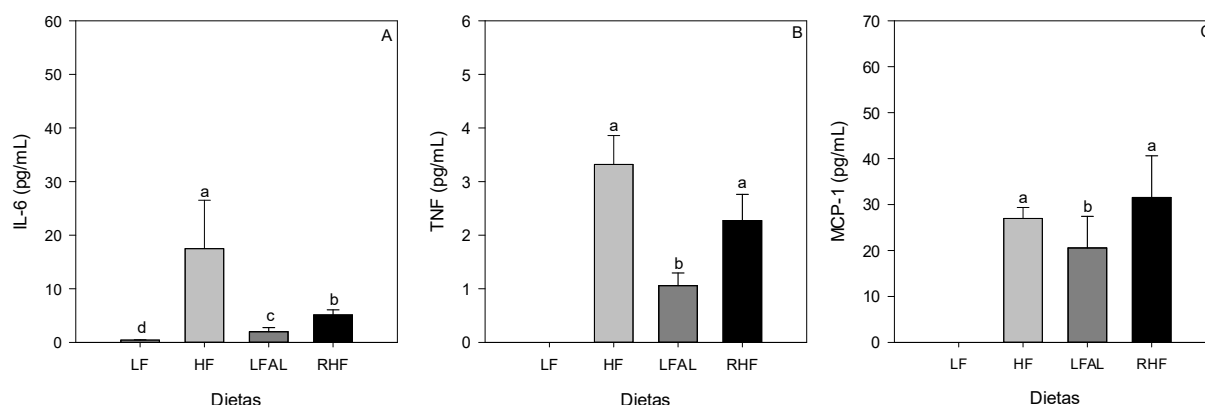


Figura 9: Concentrações de citocinas pró-inflamatórias do tecido adiposo retroperitoneal ao final da fase de indução da perda de peso. LF = dieta controle hipolipídica; HF = dieta controle hiperlipídica; LFAL = dieta hipolipídica ad libitum; RHF = dieta hiperlipídica com restrição calórica. Resultados apresentados em média±erro padrão. Barras seguidas por letras diferentes diferem entre si pela One Way ANOVA e Teste Tukey ($p < 0,05$).

Esses resultados foram também complementados por meio de análises histomorfométricas, especificamente, da hipertrofia e de características inflamatórias dos adipócitos retroperitoneais. Os adipócitos dos animais alimentados com o regime HF tornaram-se hipertrofiados em relação ao grupo LF (Figura 10). Além disso, foram notavelmente infiltrados por células inflamatórias, como pode ser visto na Figura 11, em que áreas densas em vermelho representam infiltrados de células inflamatórias. Observamos adipócitos menores (Figura 10) e com ausência ou poucas áreas com infiltrados inflamatórios (Figura 11) nos adipócitos dos animais submetidos ao regime LFAL, tornando-os mais semelhantes aos LF. Os adipócitos dos animais alimentados com o regime RHF apresentaram tanto áreas preenchidas ainda com adipócitos grandes (semelhantes ao grupo HF) quanto outras com adipócitos menores (Figura 10). Em relação aos infiltrados inflamatórios, áreas densamente inflamadas (marcadas em vermelho) ainda foram um achado comum (Figura 11).

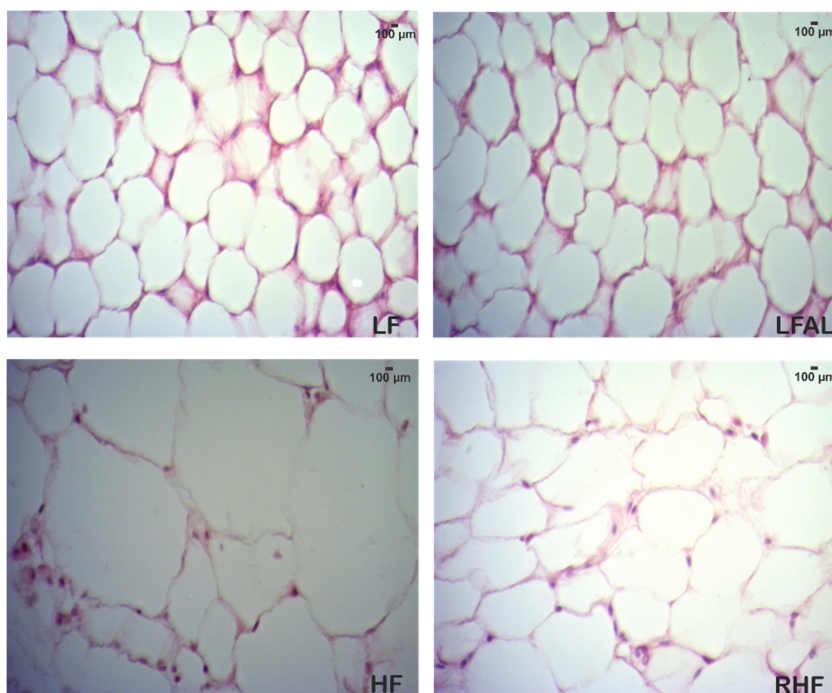


Figura 10: Fotomicrografias representando tamanho dos adipócitos do tecido retroperitoneal ao final da fase de indução da perda de peso. LF = dieta controle hipolipídica; HF = dieta controle hiperlipídica; LFAL = dieta hipolipídica *ad libitum*; RHF = dieta hiperlipídica com restrição calórica.

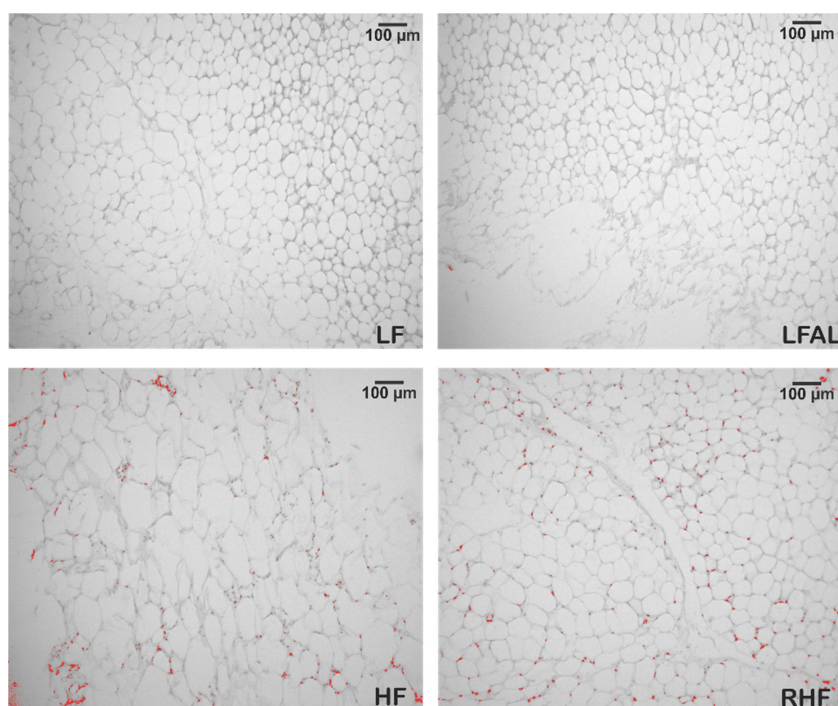


Figura 11: Fotomicrografias dos adipócitos do tecido retroperitoneal ao final da fase de indução da perda de peso. Áreas densas em vermelho indicam infiltrados inflamatórios permeando os adipócitos. LF = dieta controle hipolipídica; HF = dieta controle hiperlipídica; LFAL = dieta hipolipídica *ad libitum*; RHF = dieta hiperlipídica com restrição calórica.

Essas observações qualitativas foram confirmadas pela análise quantitativa do diâmetro, bem como da porcentagem de área total e de área de adipócitos com células inflamatórias (Figura 12A, B e C respectivamente). Depois da quantificação, verificou-se que os diâmetros dos adipócitos retroperitoneais foram reduzidos no grupo LFAL de forma semelhante ao LF e mantiveram-se intermediários entre HF e LFAL para os animais RHF ($p < 0,05$, Figura 12A). As porcentagens de células inflamatórias, tanto por área total quanto por área de adipócitos apenas foram reduzidas no grupo LFAL, igualando-se ao LF ($p < 0,05$, Figura 12B e C). Não houve diferença entre os grupos RHF e HF ($p > 0,05$, Figura 12B e C).

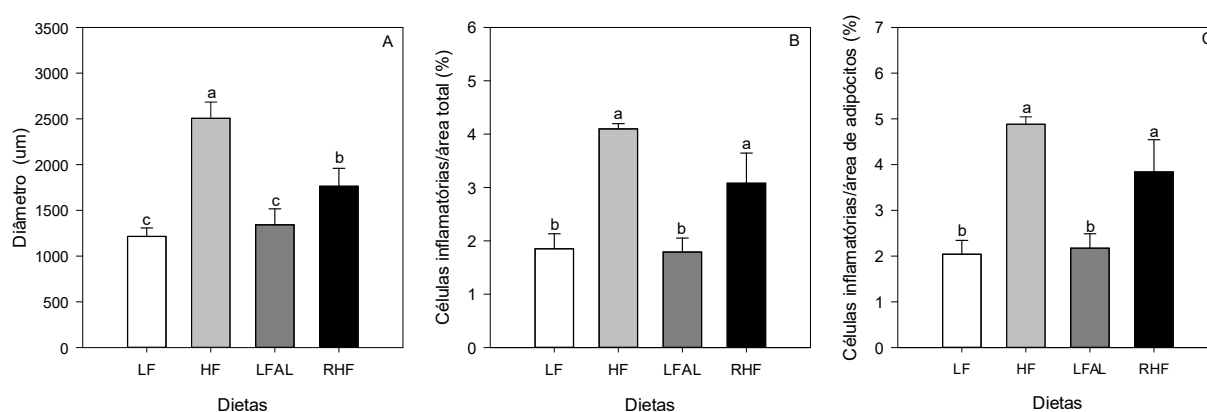


Figura 12: Diâmetro dos adipócitos (A), porcentagem de células inflamatórias por área total (B) e por área de adipócitos (C) do tecido adiposo retroperitoneal ao final da fase de indução da perda de peso. LF = dieta controle hipolipídica; HF = dieta controle hiperlipídica; LFAL = dieta hipolipídica *ad libitum*; RHF = dieta hiperlipídica com restrição calórica. Resultados apresentados em média \pm erro padrão. Barras seguidas por letras diferentes diferem entre si pela One Way ANOVA e Teste Tukey ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo investigar efeitos da perda de peso corporal induzida por uma dieta hipolipídica *ad libitum* e pela restrição calórica com dieta hiperlipídica na inflamação do tecido adiposo de camundongos obesos. Para isso, usamos um modelo animal de obesidade induzida por dieta, em seguida, submetemos os animais obesos aos regimes dietéticos propostos e ao final investigamos os efeitos diferenciais destes regimes no peso corporal, adiposidade e, especialmente, na inflamação do tecido adiposo retroperitoneal.

Em princípio, confirmamos o efeito obesogênico da dieta hiperlipídica, rica em SFA. Ao final da fase de indução da obesidade, apesar da ingestão alimentar absoluta ter sido semelhante entre os grupos experimentais, a maior ingestão calórica no grupo HF ocorreu por causa da maior densidade calórica dessa dieta, a qual foi dada pela sobrecarga na ingestão de lipídeos. Em consonância, a habilidade de transformar calorias em peso corporal foi superior neste grupo, levando ao maior ganho de peso e de adiposidade. De acordo com Buchholz e Schoeller (2004), os lipídios dietéticos, além de apresentarem maior densidade energética, também são capazes de promover maiores estoques no organismo quando comparados aos demais macronutrientes.

Adicionalmente, a qualidade desses lipídeos também pode ter impactado expressivamente no acúmulo de adiposidade dos animais HF. De acordo com Buettner *et al.* (2006) a obesidade é bem desenvolvida em camundongos, quando a fonte dietética de lipídeos apresenta grande quantidade de SFA, já que esses nutrientes são considerados mais lipogênicos em comparação aos poli-insaturados. Tem sido demonstrado que, para a indução da obesidade em roedores, a banha de porco é mais eficaz e, portanto, considerada como o melhor modelo (WHITE *et al.*, 2013).

Além disso, podemos inferir que os animais obesos estavam também inflamados, visto que tanto as concentrações hepáticas quanto séricas de PCR estavam significativamente aumentadas. Conforme descrito anteriormente, a PCR é uma proteína de fase aguda sintetizada principalmente pelo fígado (CASTELL *et al.*, 1990). A PCR sérica torna-se elevada em resposta às infecções agudas, condições inflamatórias e trauma. Neste aspecto, tem sido mostrado que os SFA em excesso são capazes de estimular respostas pró-inflamatórias por diversas vias, especialmente aquelas que envolvem os receptores *tool-like*, o que implica na secreção aumentada de diversas citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e TNF- α (TAKEDA *et al.*, 2003). A secreção aumentada de IL-6 é considerada o principal estimulador da síntese hepática da PCR. Então, a PCR é considerada um marcador da inflamação e também um preditor independente de risco cardiovascular (RIDKER, 2003).

Ao final da fase de emagrecimento, de maneira geral, ambos os regimes provocaram perda de peso. Então, podemos reforçar que a quantidade de calorias restritas no regime RHF foi suficiente para induzir balanço energético negativo. No entanto, os animais do grupo LFAL foram mais eficientes em perder peso que os RHF e, isto exerceu efeitos diferentes na adiposidade visceral, o que impactou diferentemente na inflamação deste tecido.

O grupo LFAL reduziu a adiposidade e a hipertrofia dos adipócitos viscerais em níveis dos animais LF. Possivelmente, isto levou à menor concentração tecidual de leptina com concomitante aumento da adiponectina e menor infiltração de células inflamatórias neste tecido. Em consequência, houve menor concentração tecidual de citocinas pró-inflamatórias, embora não tenham se igualado aos animais controles magros. Adicionalmente, esses achados concordam com as menores concentrações hepáticas e séricas da PCR.

Para os animais RHF, as repercussões na adiposidade não foram as mesmas. Houve apenas atenuação na adiposidade e na hipertrofia dos adipócitos viscerais, não se igualando aos LF. Apesar disto ter reduzido a concentração de leptina, não foi capaz de elevar a de adiponectina. A infiltração de células inflamatórias manteve-se elevada, tal como no grupo HF. Em consequência, não houve redução tecidual da concentração de citocinas pró-inflamatórias, à exceção da IL-6 que reduziu levemente. A concentração hepática de PCR foi atenuada em relação ao HF, mas houve redução na concentração sérica, apesar da tendência de redução observada ($p=0,0692$).

A RC pode ser considerada o componente mais importante da indução da perda de peso em humanos, já que promove balanço energético negativo, o que estimula a utilização das reservas energéticas, especialmente do tecido adiposo (SHUKLA *et al.*, 2015). No entanto, em roedores, isso não acontece exatamente desta forma. Os animais do grupo LFAL perderam peso e se igualaram aos LF, mesmo em regime *ad libitum* (sem restrição calórica). Este regime consistiu de uma dieta hipolipídica, de composição mais próxima da “normal” (balanceada) para roedores (REEVES *et al.*, 1993). Nesta condição, esses animais conseguiram igualar seus pesos corporais aos animais magros, os quais não se tornaram obesos em nenhum momento do protocolo (LF). Nós inferimos que isso ocorreu porque, a partir do momento em que os animais foram expostos a uma dieta “normal”, conseguiram ajustar sua ingestão conforme suas necessidades energéticas, sendo isto observado em roedores. De acordo com PATTERSON e LEVIN (2008), quantidades de calorias são ingeridas por roedores de acordo com suas necessidades, desde que a composição da dieta seja adequada. Em razão disto, no grupo LFAL, houve maior estímulo à utilização de reservas corporais adiposas, já que a densidade calórica da dieta LF era menos que a HF.

Além disso, a quantidade de lipídeos da dieta LF foi ajustada para torná-la levemente hipolipídica. A recomendação para roedores é que 15% das calorias sejam provenientes de lipídeos (REEVES *et al.*, 1993). No nosso estudo, utilizamos o óleo de soja para garantir a oferta de ácidos graxos essenciais e uma razão poli-insaturados/saturados igual a 4 (REEVES *et al.*, 1993) e reduzimos a oferta calórica lipídica para 10%. Além disso, podemos também salientar que o óleo de soja apresenta em sua composição aproximadamente 56% de ácido graxo linoleico (ômega-6), 21% de oleico (ômega-9) e 7% de linolênico (ômega-3) (ZAMBLAZI *et al.*, 2007), os quais são relatados como menos lipogênicos (TENG *et al.*, 2014).

Por outro lado, a restrição calórica imposta aos animais RHF induziu um balanço energético negativo, o que também foi suficiente para induzir a perda de peso. Neste caso, podemos inferir que o balanço energético negativo tenha sido o principal responsável. De acordo com Racette (1995), os estoques de lipídeos no tecido adiposo representam excesso de consumo de energia em relação ao gasto; quando a ingestão energética é menor que o gasto, os estoques adiposos são mais mobilizados para energia, promovendo a perda de peso/adiposidade.

Entretanto, podemos destacar que a restrição calórica na dieta hiperlipídica não foi suficiente para determinar a mesma eficiência na perda de peso em ambos os grupos (LFAL e RHF). Mesmo ingerindo a mesma quantidade de calorias, houve maior dificuldade em perder peso pelo grupo RHF (dada pelos CEE), o que também impactou negativamente na adiposidade visceral. Isso nos leva a inferir que a composição dessa dieta exerceu algum efeito diferencial e, mais especificamente, a quantidade de calorias advinda de lipídeos, bem como a sua composição em ácidos graxos podem ter sido determinantes. De acordo com Buettner *et al.* (2006), lipídeos dietéticos em excesso são capazes de promover maiores estoques no organismo quando comparado aos demais macronutrientes, sendo SFA mais lipogênicos.

De fato, as diferenças encontradas nos parâmetros de distribuição do peso corporal e da adiposidade corroboram esses achados, já que apesar dos menores índices de Lee para os grupos LFAL e RHF, a adiposidade visceral não reduziu de forma semelhante nesses grupos. Novamente, o excesso de lipídeos e a composição em ácidos graxos certamente tiveram maior impacto do que a restrição calórica. Matsuo e Suzuki (1994) postularam que a atividade lipolítica do tecido adiposo branco, especialmente o visceral, é reduzida em razão da ingestão de dieta rica em SFA e pode ser consequência de uma menor afinidade entre a lipase hormônio-sensível e os triglicerídeos ricos em SFA. Por outro lado, Takeuchi *et al.* (1995) também postularam que a atividade do complexo carnitina palmitoil-transferase (CPT) e, consequentemente, a β -oxidação, também podem ser reduzidas com a alta ingestão de SFA, independente da RC.

Outro fator que tem sido apontado, é que a maior ingestão de SFA promove redução na atividade das dessaturases (enzimas que participam da biossíntese de ácidos graxos insaturados), o que resulta em maior disponibilidade de SFA, que acabam sendo incorporados nas membranas celulares em maior quantidade. Isso leva às alterações na permeabilidade e no transporte transmembrana porque afeta o funcionamento da bomba de Na/K e reduz o transporte de elétrons nas membranas mitocondriais. Em última instância, reduz a taxa metabólica basal celular, contribuindo para uma maior adiposidade (PAN *et al.*, 1994).

Assim, os efeitos diferenciais causados por ambos os regimes na adiposidade visceral nos instigaram a investigar, em nível tecidual, marcadores diretamente relacionados à inflamação. De forma um pouco discrepante, em relação às diferenças encontradas na adiposidade visceral (Figuras 7B e 12A), as concentrações teciduais de leptina foram significativamente e semelhantemente reduzidas por ambos os regimes LFAL e RHF. Deste modo, o compartimento de tecido adiposo avaliado foi mais sensível à restrição calórica apresentando também menor secreção de leptina. De acordo com Dullo *et al.* (2010), a secreção tecidual e as concentrações circulantes de leptina diminuem sob condição de jejum ou restrição calórica e aumentam em resposta à ingestão alimentar. Além disso, a secreção de leptina pelo adipócito é condicionada tanto por sua hiperplasia, quanto por sua hipertrofia (FRIED *et al.*, 2000). Nós observamos atenuação da hipertrofia dos adipócitos retroperitoneais (Figura 12A), o que também pode ter contribuído para este achado.

Ao contrário da leptina, a secreção de adiponectina manteve-se reduzida na restrição calórica com dieta hiperlipídica, diferentemente do regime LFAL o qual foi capaz de elevar a secreção desta adipocina em valores semelhantes ao regime LF. À luz do conhecimento atual, sabe-se que a secreção tecidual e as concentrações circulantes de adiponectina estão reduzidas em humanos e roedores obesos. Sabe-se também que a restrição calórica é capaz de elevar tais concentrações em ambos, humanos e roedores (BASTARD *et al.*, 2006). No entanto, na condição de restrição calórica com dieta hiperlipídica, os dados são escassos e controversos.

Inicialmente, deve-se considerar que apesar do regime RHF ter promovido perda de peso corporal semelhante ao LFAL, a adiposidade visceral se manteve alta. Este é um dos fatores que pode ter mantido a secreção de adiponectina reduzida no tecido avaliado. De acordo com Ryo *et al.* (2004) a secreção e as concentrações plasmáticas de adiponectina são negativamente correlacionados com o acúmulo de gordura, especialmente na região visceral. Fu *et al.* (2005) e Meyer *et al.* (2013), postulam que quanto maior o tamanho do adipócito menor a concentração de adiponectina; em contrapartida, quanto menor o tamanho do adipócito e maior o número de adipócitos, maior será a síntese de adiponectina, o que poderia explicar em parte esse resultado

no grupo RHF, já que houve apenas uma pequena redução no tamanho dos adipócitos do tecido estudado.

Além disso, quando avaliamos a razão leptina-adiponectina, observamos que ela foi restabelecida no grupo LFAL e apenas levemente reduzida no grupo RHF, corroborando também os achados anteriores. Estudos diversos têm relatado que a razão leptina/adiponectina está diretamente correlacionada com a gordura corporal, especialmente a visceral, e pode ser um marcador útil da inflamação, da resistência à insulina e da aterogênese (SATO *et al.*, 2004; ODA *et al.*, 2008; KROMMIDAS *et al.*, 2010).

É importante destacar que a inflamação tecidual da obesidade é, em parte, caracterizada pela produção anormal de adipocinas e citocinas pró-inflamatórias, dentre outros fatores, tanto pelos adipócitos quanto por células inflamatórias que infiltram o tecido disfuncional. Histologicamente, apesar de o regime RHF ter atenuado a hipertrofia dos adipócitos, não impactou na quantidade do infiltrado de células inflamatórias, o qual permaneceu elevado no tecido adiposo desses animais. Esses achados corroboraram a secreção aumentada de citocinas pró-inflamatórias nesse grupo, embora os resultados tenham sido heterogêneos, pois não reduziu o TNF e a MCP-1 e apenas atenuou a de IL-6. O regime LFAL foi o que mais reduziu a produção dessas citocinas, o que também está de acordo com a redução do infiltrado inflamatório e a secreção das adipocinas. É importante também comentar que o TNF e a MCP-1 não foram detectados pelo método de análise utilizado no grupo LF (animais magros), mas no grupo LFAL, ambas foram quantificadas, indicando que, mesmo após o emagrecimento, ainda houve alguma produção dessas citocinas pelo tecido adiposo. Adicionalmente, a redução de IL-6 neste grupo (LFAL), não se igualou ao LF.

Os mecanismos pelos quais os SFA favorecem a inflamação ainda carecem de investigações. No entanto, algumas hipóteses poderiam contribuir para o entendimento desses resultados. Dietas com sobrecarga lipídica e de SFA (DEOPURKAR *et al.*, 2010) são capazes de promover a captação de lipopolissacarídeos (oriundos de bactérias gram-negativas) pelo intestino (MOREIRA *et al.*, 2012). A subsequente endotoxemia pós-prandial causada por este fato está associada com a inflamação crônica de baixo grau, com a resistência à insulina e com a obesidade (ERRIDGE *et al.*, 2007; CANI *et al.*, 2009) porque esses compostos têm se mostrado ligantes de receptores que ativam vias que controlam a expressão de genes inflamatórios, no tecido adiposo e em outros tecidos. O exemplo clássico são os receptores do tipo *tool-like* (TLR-4 e TLR-2). Em adipócitos e macrófagos, esses receptores tornam-se ativados por lipopolissacarídeos e por SFA, o que facilita a translocação do NF- κ B para o núcleo, e induz a ativação de vias de sinalização que culminam com a maior expressão de genes pró-inflamatórios,

aumentando a secreção de seus produtos e contribuindo assim para a instalação, manutenção ou piora da inflamação (RUIZ-NÚÑEZ *et al.*, 2016).

É importante também ressaltar que todos esses achados estão em consonância com as medidas de PCR, tanto séricas quanto hepáticas. Constatamos maiores concentrações séricas de PCR para o grupo RHF em comparação ao LFAL, o qual se igualou ao LF. Adicionalmente, apesar de, em nível hepático, ter havido uma atenuação da secreção desta proteína no grupo RHF, isso não se refletiu em sua concentração sérica, as quais ainda foram semelhantes ao grupo HF. Adicionalmente, os pesos absolutos e relativos dos fígados, também se mantiveram semelhantes ao grupo HF, sugerindo maior deposição de gordura neste órgão.

As concentrações de IL-6 nos grupos HF e RHF são a razão mais provável para os achados séricos e hepáticos da PCR nesses grupos. A IL-6 é uma citocina que ativa a produção de PCR pelo fígado, sendo então, um indicador indireto da secreção de PCR *in vivo* (BATAILLE *et al.*, 1992). Aproximadamente 25 a 30% da IL-6 sérica origina-se do tecido adiposo e a secreção de IL-6 da gordura subcutânea é proporcional à gordura corporal total (MOHAMED-ALI *et al.*, 1997). Adicionalmente, adipócitos viscerais secretam aproximadamente 2 a 3 vezes mais IL-6 quando comparados com adipócitos subcutâneos (FRIED *et al.*, 1998). Nós observamos maior produção de IL-6 pelo tecido adiposo retroperitoneal nos animais HF, sendo que o regime RHF apenas atenuou a secreção desta citocina, o que corroborou a atenuação da secreção hepática da PCR, mesmo ainda não refletindo em suas concentrações circulantes. Assim, a inflamação sistêmica se manteve no grupo RHF.

7 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS E CONCLUSÃO

- Ao final da fase de indução da perda de peso, os pesos corporais finais dos grupos alimentados com dieta hipolípídica *ad libitum* e restrição calórica com dieta hiperlipídica foram semelhantes. Entretanto, o grupo RHF foi menos eficiente em perder peso corporal, especialmente gordura visceral.
- O regime LFAL reduziu a adiposidade e a hipertrofia dos adipócitos viscerais, levando à menor concentração de leptina com concomitante aumento da adiponectina e menor infiltração de células inflamatórias neste tecido. Houve menor concentração tecidual de citocinas pró-inflamatórias, o que possivelmente refletiu em menor concentração hepática e circulante de PCR.
- O regime RHF atenuou a adiposidade, a hipertrofia dos adipócitos viscerais e reduziu a concentração local de leptina, mas não foi capaz de elevar a de adiponectina. Além disso, a infiltração de células inflamatórias manteve-se elevada. Não houve redução da concentração de citocinas pró-inflamatórias, à exceção da IL-6. A concentração hepática de PCR foi atenuada, o que não ocorreu com a sérica.

Em conjunto, nossos resultados indicam que a RC com dieta hiperlipídica foi menos eficiente em promover a perda de peso e de adiposidade e não melhorou a inflamação do tecido adiposo visceral. Assim, a sobrecarga dietética de lipídeos (60% das calorias) e de ácidos graxos saturados foram mais determinantes da inflamação local do que a restrição calórica *per se*.

8 REFERÊNCIAS

- AJUWON, K. M.; SPURLOCK, M. E. Palmitate Activates the NF- κ B Transcription Factor and Induces IL-6 and TNF α Expression in 3T3-L1 Adipocytes. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 8, p. 1841-1846, 2005.
- ARKAN, M. C. et al. IKK-[beta] links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nature medicine**, v. 11, n. 2, p. 191, 2005.
- ARMANI, A. et al. Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 110, n. 3, p. 564-572, 2010.
- BARZILAI, N. et al. Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance. **Diabetes**, v. 48, n. 1, p. 94-98, 1999.
- BASTARD, J.-P. et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **European cytokine network**, v. 17, n. 1, p. 4-12, 2006.
- BASU, A. et al. Dietary factors that promote or retard inflammation. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 26, n. 5, p. 995-1001, 2006.
- BATAILLE, R.; KLEIN, B. C-reactive protein levels as a direct indicator of interleukin-6 levels in humans in vivo. **Arthritis & Rheumatism**, v. 35, n. 8, p. 982-983, 1992.
- BERNLOHR, D. A. et al. Chapter 10: Adipose tissue and lipid metabolism. In: (Ed.). **New Comprehensive Biochemistry**: Elsevier, v.36, 2002. p.263-289.
- BOUSTANY, C. M. et al. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 287, n. 4, p. R943-R949, 2004.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. **Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2016** Brasília: Ministério da Saúde 2017.
- BUCHHOLZ, A. C.; SCHOELLER, D. A. Is a calorie a calorie? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 899S-906S, 2004.
- BUETTNER, R. et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. **Journal of molecular endocrinology**, v. 36, n. 3, p. 485-501, 2006.
- CALDER, P. C. Dietary modification of inflammation with lipids. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 61, n. 3, p. 345-358, 2002.
- _____. n- 3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **The**

American journal of clinical nutrition, v. 83, n. 6, p. S1505-1519S, 2006.

CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. The Role of the Gut Microbiota in Energy Metabolism and Metabolic Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 13, p. 1546-1558, 2009.

CAPUTO, T. et al. From chronic overnutrition to metaflammation and insulin resistance: adipose tissue and liver contributions. **FEBS Letters**, 2017.

CASTELL, J. V. et al. Acute-phase response of human hepatocytes: Regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. **Hepatology**, v. 12, n. 5, p. 1179-1186, 1990.

CASTELLO, L. et al. Alternate-day fasting protects the rat heart against age-induced inflammation and fibrosis by inhibiting oxidative damage and NF-kB activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 1, p. 47-54, 2010.

CASTRO, A. et al. Obesity, insulin resistance and comorbidities - Mechanisms of association. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, p. 600-609, 2014.

CASTRO, É. et al. Critical review of beige adipocyte thermogenic activation and contribution to whole-body energy expenditure. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, 2017.

CEZÁRIO, A. C. et al. A vigilância, o controle e a prevenção das doenças crônicas não transmissíveis: DCNT no contexto do Sistema Único Brasileiro-situação e desafios atuais. In: (Ed.). **A vigilância, o controle e a prevenção das doenças crônicas não transmissíveis: DCNT no contexto do Sistema Único Brasileiro-situação e desafios atuais**: Brasil. Ministério da Saúde, 2005.

CHUSYD, D. E. et al. Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. **Frontiers in Nutrition**, v. 3, p. 10, 2016.

CINTI, S. The adipose organ at a glance. **Disease Models & Mechanisms**, v. 5, n. 5, p. 588-594, 2012.

COKER, R. H. et al. The impact of exercise training compared to caloric restriction on hepatic and peripheral insulin resistance in obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 11, p. 4258-4266, 2009.

DELAIGLE, A. L. M. et al. Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies. **Endocrinology**, v. 145, n. 12, p. 5589-5597, 2004.

DEOPURKAR, R. et al. Differential Effects of Cream, Glucose, and Orange Juice on Inflammation, Endotoxin, and the Expression of Toll-Like Receptor-4 and Suppressor of Cytokine Signaling-3. **Diabetes Care**, v. 33, n. 5, p. 991-997, 2010.

DISPIRITO, J. R.; MATHIS, D. Immunological contributions to adipose tissue homeostasis. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 5, p. 315-321, 2015.

DUE, A. et al. Comparison of 3 ad libitum diets for weight-loss maintenance, risk of cardiovascular disease, and diabetes: a 6-mo randomized, controlled trial. **The American journal of clinical nutrition**, v. 88, n. 5, p. 1232-1241, 2008.

ENOS, R. T. et al. Influence of dietary saturated fat content on adiposity, macrophage behavior, inflammation, and metabolism: composition matters. **Journal of lipid research**, v. 54, n. 1, p. 152-163, 2013.

ERRIDGE, C. et al. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 86, n. 5, p. 1286-1292, 2007.

ESPOSITO, K. et al. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. **Jama**, v. 289, n. 14, p. 1799-1804, 2003.

FATTORE, E. et al. Palm oil and blood lipid-related markers of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis of dietary intervention trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 99, n. 6, p. 1331-1350, 2014.

FATTORE, G. et al. Critical review of economic evaluation studies of interventions promoting low-fat diets. **Nutrition reviews**, v. 72, n. 11, p. 691-706, 2014.

FERNÁNDEZ-REAL, J.-M. et al. Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition. **Diabetes Care**, v. 26, n. 5, p. 1362-1368, 2003.

FERRUCCI, L. et al. Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 2, p. 439-446, 2006.

FIELD, B. C. Neuroendocrinology of obesity. **British medical bulletin**, v. 109, n. 1, 2014.

FINUCANE, F. M. et al. Correlation of the leptin: adiponectin ratio with measures of insulin resistance in non-diabetic individuals. **Diabetologia**, v. 52, n. 11, p. 2345-2349, 2009.

FORSYTHE, C. E. et al. Comparison of low fat and low carbohydrate diets on circulating fatty acid composition and markers of inflammation. **Lipids**, v. 43, n. 1, p. 65-77, 2008.

FRAYN, K. N. Visceral fat and insulin resistance — causative or correlative? **British Journal of Nutrition**, v. 83, n. S1, p. S71-S77, 2007.

FRIED, S. K. et al. Omental and Subcutaneous Adipose Tissues of Obese Subjects Release Interleukin-6: Depot Difference and Regulation by Glucocorticoid1. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 83, n. 3, p. 847-850, 1998.

FRIED, S. K. et al. Regulation of Leptin Production in Humans. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 12, p. 3127S-3131S, 2000.

FU, Y. et al. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. **Journal of lipid research**, v. 46, n. 7, p. 1369-1379, 2005.

FUENTES, E. et al. Mechanisms of chronic state of inflammation as mediators that link obese adipose tissue and metabolic syndrome. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013.

GABRIELY, I. et al. Removal of Visceral Fat Prevents Insulin Resistance and Glucose Intolerance of Aging. **An Adipokine-Mediated Process?**, v. 51, n. 10, p. 2951-2958, 2002.

GESTA, S. et al. Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 242-256, 2007.

GO, A. S. et al. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics—2013 Update. **A Report From the American Heart Association**, v. 127, n. 1, p. 143-152, 2013.

GOOSSENS, G. H. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. **Physiology & Behavior**, v. 94, n. 2, p. 206-218, 2008.

GREGOIRE, F. M. et al. Understanding Adipocyte Differentiation. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 3, p. 783-809, 1998.

HALBERG, N. et al. Hypoxia-inducible factor 1 α induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. **Molecular and cellular biology**, v. 29, n. 16, p. 4467-4483, 2009.

HAN, C. Y. et al. Differential effect of saturated and unsaturated free fatty acids on the generation of monocyte adhesion and chemotactic factors by adipocytes. **Diabetes**, v. 59, n. 2, p. 386-396, 2010.

HAUNER, H. The new concept of adipose tissue function. **Physiology & Behavior**, v. 83, n. 4, p. 653-658, 2004.

HIVERT, M.-F. et al. Associations of adiponectin, resistin, and tumor necrosis factor- α with insulin resistance. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 8, p. 3165-3172, 2008.

HOPKINS, M.; BLUNDELL, J. E. Energy balance, body composition, sedentariness and appetite regulation: pathways to obesity. **Clinical Science**, v. 130, n. 18, p. 1615-1628, 2016.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . **Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 4, p. 1543, 1994.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, 1993.

ITOH, M. et al. Adipose Tissue Remodeling as Homeostatic Inflammation. **International Journal of Inflammation**, v. 2011, 2011.

JANZ, K. F. et al. Physical Activity, Not Sedentary Time, Predicts Dual-Energy X-ray Absorptiometry-measured Adiposity Age 5 to 19 Years. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 49, n. 10, p. 2071-2077, 2017.

JELLEMA, A. et al. Weight reduction, but not a moderate intake of fish oil, lowers concentrations of inflammatory markers and PAI-1 antigen in obese men during the fasting and postprandial state. **European journal of clinical investigation**, v. 34, n. 11, p. 766-773, 2004.

JUNG, M.-J. et al. Chronic Repression of mTOR Complex 2 Induces Changes in the Gut Microbiota of Diet-induced Obese Mice. **Scientific Reports**, v. 6, p. 30887, 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Guanabara e Koogan, 2008.

KALUPAHANA, N. S. et al. (n-3) Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 2, n. 4, p. 304-316, 2011.

KAMEI, N. et al. Overexpression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Adipose Tissues Causes Macrophage Recruitment and Insulin Resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 36, p. 26602-26614, 2006.

KANDA, H. et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 6, p. 1494-1505, 2006.

KANHAI, D. et al. The risk of general and abdominal adiposity in the occurrence of new vascular events and mortality in patients with various manifestations of vascular disease. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 5, p. 695, 2012.

KEWALRAMANI, G. et al. Palmitate-activated macrophages confer insulin resistance to muscle cells by a mechanism involving protein kinase C θ and ϵ . **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26947, 2011.

KHAN, T. et al. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. **Molecular and cellular biology**, v. 29, n. 6, p. 1575-1591, 2009.

KIEN, C. L. Dietary interventions for metabolic syndrome: role of modifying dietary fats. **Current diabetes reports**, v. 9, n. 1, p. 43-50, 2009.

KIM, C. S. et al. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. **Int J Obes**, v. 30, n. 9, p. 1347-1355, 2006.

KRISHNAN, J. et al. Dietary obesity-associated Hif1 α activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD⁺ system. **Genes & development**, v. 26, n. 3, p. 259-270, 2012.

KROMMIDAS, G. et al. Plasma leptin and adiponectin in COPD exacerbations: Associations with inflammatory biomarkers. **Respiratory Medicine**, v. 104, n. 1, p. 40-46, 2010.

KUSMINSKI, C. M. et al. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. **Nat Rev Drug Discov**, v. 15, n. 9, p. 639-660, 2016.

LACKEY, D. E.; OLEFSKY, J. M. Regulation of metabolism by the innate immune system. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 15, 2016.

LASTRA, G. et al. The Role of β -Cell Dysfunction in the Cardiometabolic Syndrome. **Journal of the cardiometabolic syndrome**, v. 1, n. 1, p. 41-46, 2006.

LEE, J. Y. et al. Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal of lipid research**, v. 44, n. 3, p. 479-486, 2003.

LOFFREDA, S. et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. **The FASEB Journal**, v. 12, n. 1, p. 57-65, 1998.

LU, Y.-P. et al. Surgical removal of the parametrial fat pads stimulates apoptosis and inhibits UVB-induced carcinogenesis in mice fed a high-fat diet. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 23, p. 9065-9070, 2012.

LUMENG, C. N. et al. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 175, 2007.

MAACHI, M. et al. Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNF [alpha], leptin and IL-6 levels in obese women. **International journal of obesity**, v. 28, n. 8, p. 993, 2004.

MAJKA, S. M. et al. Concise review: adipocyte origins: weighing the possibilities. **Stem Cells**, v. 29, n. 7, p. 1034-1040, 2011.

MAKKI, K. et al. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. **ISRN inflammation**, v. 2013, 2013.

MATARESE, G. et al. Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 14, p. 5150-5155, 2005.

MATSUO, T.; SUZUKI, M. Beef Tallow Diet Decreases Lipoprotein Lipase Activities in Brown Adipose Tissue, Heart, and Soleus Muscle by Reducing Sympathetic Activities in Rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 40, n. 6, p. 569-581, 1994.

MAURIEGE, P. et al. Regional and gender variations in adipose tissue lipolysis in response to weight loss. **Journal of lipid research**, v. 40, n. 9, p. 1559-1571, 1999.

MEYER, L. K. et al. Adipose tissue depot and cell size dependency of adiponectin synthesis and secretion in human obesity. **Adipocyte**, v. 2, n. 4, p. 217-226, 2013.

MOHAMED-ALI, V. et al. Subcutaneous Adipose Tissue Releases Interleukin-6, But Not Tumor Necrosis Factor- α , in Vivo. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 12, p. 4196-4200, 1997.

MOREIRA, A. P. B. et al. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 5, p. 801-809, 2012.

MORINO, K. et al. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. **Diabetes**, v. 55, n. Suppl 2, p. S9-S15, 2006.

MUZUMDAR, R. et al. Visceral adipose tissue modulates mammalian longevity. **Aging cell**, v. 7, n. 3, p. 438-440, 2008.

NONOGAKI, K. et al. Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. **Endocrinology**, v. 136, n. 5, p. 2143-2149, 1995.

ODA, N. et al. The ratio of leptin to adiponectin can be used as an index of insulin resistance.

Metabolism, v. 57, n. 2, p. 268-273, 2008.

OH, D. Y. et al. Increased Macrophage Migration Into Adipose Tissue in Obese Mice. **Diabetes**, v. 61, n. 2, p. 346-354, 2012.

OKAMOTO, M. et al. Adiponectin induces insulin secretion in vitro and in vivo at a low glucose concentration. **Diabetologia**, v. 51, n. 5, p. 827-835, 2008.

OUCHI, N. et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules. **Circulation**, v. 100, n. 25, p. 2473-2476, 1999.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 2, p. 85, 2011.

OWAN, T. et al. Favorable changes in cardiac geometry and function following gastric bypass surgery: 2-year follow-up in the Utah obesity study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 57, n. 6, p. 732-739, 2011.

PADOVANI, R. M. et al. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. **Revista de Nutrição**, 2006.

PAN, D. A. et al. Dietary fats, membrane phospholipids and obesity. **The Journal of nutrition**, v. 124, n. 9, p. 1555-1565, 1994.

PARK, S. et al. Calorie restriction with a high-fat diet effectively attenuated inflammatory response and oxidative stress-related markers in obese tissues of the high diet fed rats. **Mediators of inflammation**, v. 2012, 2012.

PATSOURIS, D. et al. Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. **Cell metabolism**, v. 8, n. 4, p. 301-309, 2008.

PATTERSON, C. M.; LEVIN, B. E. Role of Exercise in the Central Regulation of Energy Homeostasis and in the Prevention of Obesity. **Neuroendocrinology**, v. 87, n. 2, p. 65-70, 2008.

PETRO, A. E. et al. Fat, carbohydrate, and calories in the development of diabetes and obesity in the C57BL/6J mouse. **Metabolism**, v. 53, n. 4, p. 454-457, 2004.

PLAT, J. et al. Weight loss, but not fish oil consumption, improves fasting and postprandial serum lipids, markers of endothelial function, and inflammatory signatures in moderately obese men. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 12, p. 2635-2640, 2007.

PRADHAN, A. D. et al. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. **Jama**, v. 286, n. 3, p. 327-334, 2001.

RACETTE, S. B. et al. Exercise enhances dietary compliance during moderate energy restriction in obese women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 2, p. 345-9, 1995.

REEVES, P. G. et al. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

RIDKER, P. M. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. **Circulation**, v. 107, n. 3, p. 363-369, 2003.

ROCHA, V. Z.; FOLCO, E. J. Inflammatory concepts of obesity. **International journal of inflammation**, v. 2011, 2011.

RUIZ-NÚÑEZ, B. et al. The relation of saturated fatty acids with low-grade inflammation and cardiovascular disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 36, n. Supplement C, p. 1-20, 2016.

RUTH, M. R. et al. Consuming a hypocaloric high fat low carbohydrate diet for 12 weeks lowers C-reactive protein, and raises serum adiponectin and high density lipoprotein-cholesterol in obese subjects. **Metabolism**, v. 62, n. 12, p. 1779-1787, 2013.

RUTKOWSKI, J. M. et al. The cell biology of fat expansion. **J Cell Biol**, v. 208, n. 5, p. 501-512, 2015.

RYO, M. et al. Adiponectin as a Biomarker of the Metabolic Syndrome. **Circulation Journal**, v. 68, n. 11, p. 975-981, 2004.

SABIN, M. A. et al. Viewpoint article: Childhood obesity—looking back over 50 years to begin to look forward. **Journal of paediatrics and child health**, v. 51, n. 1, p. 82-86, 2015.

SACKS, F. M. et al. Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 9, p. 859-873, 2009.

SAKAMOTO, Y. et al. Tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 (IL-8) expression in endometriotic stromal cells, probably through nuclear factor- κ B activation: gonadotropin-releasing hormone agonist treatment reduced IL-8 expression. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 2, p. 730-735, 2003.

SAMARAS, K. et al. Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes. **Obesity**, v. 18, n. 5, p. 884-889, 2010.

SATOH, N. et al. Leptin-to-Adiponectin Ratio as a Potential Atherogenic Index in Obese Type 2 Diabetic Patients. **Diabetes Care**, v. 27, n. 10, p. 2488-2490, 2004.

SETHI, J. K.; VIDAL-PUIG, A. J. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. **Journal of lipid research**, v. 48, n. 6, p. 1253-1262, 2007.

SEVERI, I. et al. Opposite effects of a high-fat diet and calorie restriction on ciliary neurotrophic factor signaling in the mouse hypothalamus. **Frontiers in neuroscience**, v. 7, 2013.

SHARMAN, M. J.; VOLEK, J. S. Weight loss leads to reductions in inflammatory biomarkers after a very-low-carbohydrate diet and a low-fat diet in overweight men. **Clinical Science**, v. 107, n. 4, p. 365-369, 2004.

SHEN, W. et al. MRI-measured bone marrow adipose tissue is inversely related to DXA-measured bone mineral in Caucasian women. **Osteoporosis international**, v. 18, n. 5, p. 641-

647, 2007.

SHUKLA, A. P. et al. Treatment of obesity in 2015. **Journal of cardiopulmonary rehabilitation and prevention**, v. 35, n. 2, p. 81-92, 2015.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 3, p. 787, 2012.

SINGH, T.; NEWMAN, A. B. Inflammatory markers in population studies of aging. **Ageing research reviews**, v. 10, n. 3, p. 319-329, 2011.

SNODGRASS, R. G. et al. Inflammasome-mediated secretion of IL-1 β in human monocytes through TLR2 activation; modulation by dietary fatty acids. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 8, p. 4337-4347, 2013.

SORISKY, A. et al. Macrophage-induced adipose tissue dysfunction and the preadipocyte: should I stay (and differentiate) or should I go? **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 4, n. 1, p. 67-75, 2013.

SUGANAMI, T.; OGAWA, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. **Journal of leukocyte biology**, v. 88, n. 1, p. 33-39, 2010.

SUGANAMI, T. et al. Adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation. **Endocrine journal**, v. 59, n. 10, p. 849-857, 2012.

SUN, K. et al. Selective inhibition of hypoxia-inducible factor 1 α ameliorates adipose tissue dysfunction. **Molecular and cellular biology**, v. 33, n. 5, p. 904-917, 2013.

SUN, K. et al. Adipose tissue remodeling and obesity. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 6, p. 2094, 2011.

SUN, K. et al. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. **Cell metabolism**, v. 18, n. 4, p. 470-477, 2013.

TAKEDA, K. et al. Toll-like receptors. **Annual review of immunology**, v. 21, n. 1, p. 335-376, 2003.

TAKEUCHI, H.; MATSUO, T.; TOKUYAMA, K.; SHIMOMURA, Y.; SUZUKI, M. Diet-induced thermogenesis is lower in rats fed a lard diet than in those fed a high oleic safflower oil diet, a safflower oil diet or a linseed oil diet. **Journal Nutrition**, v. 125, p. 920-925, 1995.

TENG, K.-T. et al. Modulation of obesity-induced inflammation by dietary fats: mechanisms and clinical evidence. **Nutrition Journal**, v. 13, n. 1, p. 12, 2014.

TCHERNOF, A.; DESPRÉS, J.-P. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. **Physiological reviews**, v. 93, n. 1, p. 359-404, 2013.

TCHKONIA, T. et al. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. **Cell metabolism**, v. 17, n. 5, p. 644-656, 2013.

TORRES-LEAL, F. L. et al. **Chapter 6: Adipose Tissue Inflammation and Insulin**

Resistance. Insulin Resistance. ARORA, S.: InTech 2012.

TRAYHURN, P. Hypoxia and adipocyte physiology: implications for adipose tissue dysfunction in obesity. **Annual review of nutrition**, v. 34, p. 207-236, 2014.

VAGUE, J. The Degree of Masculine Differentiation of Obesities: A FACTOR DETERMINING PREDISPOSITION TO DIABETES, ATHEROSCLEROSIS, GOUT, AND URIC CALCULOUS DISEASE. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 4, n. 1, p. 20-34, 1956.

VIEIRA, V. J. et al. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 5, p. E1164-E1171, 2009.

WANG, Y. C. et al. Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. **The Lancet**, v. 378, n. 9793, p. 815-825, 2011.

WASINSKI, F. et al. Exercise and caloric restriction alter the immune system of mice submitted to a high-fat diet. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013.

WEATHERILL, A. R. et al. Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through TLR4. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 9, p. 5390-5397, 2005.

WEISBERG, S. P. et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 1, p. 115-124, 2006.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796, 2003.

WHITE, S. et al. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância a glicose. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 57, n. 5, p. 339-45, 2013.

WHO. **Global strategy on diet, physical activity and health** 2004.

_____. Obesity and overweight 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> >. Acesso em: setembro 2017.

WILLIAMS, L. M. et al. Rac mediates TNF-induced cytokine production via modulation of NF- κ B. **Molecular immunology**, v. 45, n. 9, p. 2446-2454, 2008.

WOLF, A. M. et al. Up-regulation of the anti-inflammatory adipokine adiponectin in acute liver failure in mice. **Journal of hepatology**, v. 44, n. 3, p. 537-543, 2006.

WOLF, A. M. et al. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 323, n. 2, p. 630-635, 2004.

WU, H. et al. CD11c expression in adipose tissue and blood and its role in diet-induced obesity. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 30, n. 2, p. 186-192, 2010.

XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1821, 2003.

YAMAGUCHI, N. et al. Adiponectin inhibits Toll-like receptor family-induced signaling. **FEBS letters**, v. 579, n. 30, p. 6821-6826, 2005.

YAQOOB, P. et al. Encapsulated fish oil enriched in a-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. **Eur J Clin Invest**, v. 30, p. 260-74, 2000.

YOKOTA, T. et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. **Blood**, v. 96, n. 5, p. 1723-1732, 2000.

YOSHIMURA, T. M. et al. Photobiomodulation reduces abdominal adipose tissue inflammatory infiltrate of diet-induced obese and hyperglycemic mice. **Journal of Biophotonics**, v. 9, n. 11-12, p. 1255-1262, 2016.

ZAMBLAZI, R. C. et al. Fatty acid composition of vegetable oils and fats. **B. ceppa, Curitiba**, v. 25, n. 1, p. 111-120, 2007.